

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BIANCA DO AMARAL

AVALIAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA EXTRAÇÃO DE CONTAMINANTES DE
PREOCUPAÇÃO EMERGENTE EM DIFERENTES MATRIZES AMBIENTAIS

CURITIBA

2018

BIANCA DO AMARAL

AVALIAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS PARA EXTRAÇÃO DE CONTAMINANTES DE
PREOCUPAÇÃO EMERGENTE EM DIFERENTES MATRIZES AMBIENTAIS

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em
Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade
Federal do Paraná, como requisito parcial à
obtenção do título de Doutor em Química Analítica

Orientadora: Profa. Dra. Noemi Nagata
Coorientador: Prof. Dr. Patricio G. Peralta-Zamora

CURITIBA

2018

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

A485a Amaral, Bianca do

Avaliação do método QuEChERS para extração de contaminantes de preocupação emergente em diferentes matrizes ambientais / Bianca do Amaral – Curitiba, 2018

171p. : il. [algumas color.] ; 30 cm.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2018.

Orientadora: Noemi Nagata

Coorientador: Patricio G. Peralta-Zamora

Bibliografia: p. 150-171.

1. Química analítica. 2. Micropoluentes. 3. Água – poluição. I. Universidade Federal do Paraná. II. Nagata, Noemi. III. Peralta-Zamora, Patricio G. IV. Título.

CDD: 543.0896

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585


TERMO DE APROVAÇÃO

**AVALIAÇÃO DO MÉTODO QUECHERS PARA EXTRAÇÃO DE
CONTAMINANTES DE PREOCUPAÇÃO EMERGENTE EM
DIFERENTES MATRIZES AMBIENTAIS**

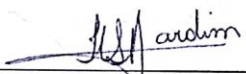
por

BIANCA DO AMARAL


Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química, pela Comissão Examinadora composta por:



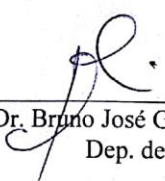
Prof.ª Dr.ª Noemi Nagata
Orientador
Dep. de Química – UFPR



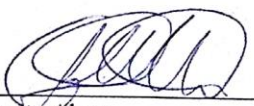
Prof.ª Dr.ª Isabel Cristina Sales Fontes Jardim
Instituto de Química – UNICAMP



Prof. Dr. Júlio César Rodrigues de Azevedo
Dep. Acadêmico de Química e Biologia – UTFPR



Prof. Dr. Bruno José Gonçalves da Silva
Dep. de Química – UFPR



Prof. Dr. Gilberto Abate
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 16 de março de 2018.

DEDICATÓRIA

Dedico a todos aqueles que me inspiraram e
me ensinaram a ser uma pessoa melhor.

AGRADECIMENTOS

À minha família, Catarina e Wilson e minha irmã Bruna, fontes de força, valores e apoio. Obrigada por me incentivarem sempre, nunca terei palavras suficientes para agradecer.

Ao meu marido Tiago, com quem compartilho a vida há mais de 14 anos, pela paciência, incentivo, dedicação, compreensão e amor, que a cada dia construímos e fortalecemos.

Aos meus queridos amigos e orientadores Noemi Nagata e Patricio Peralta-Zamora pela confiança, exemplo, momentos felizes e difíceis divididos, carinho, respeito, tempo, compreensão e dedicação essenciais para meu crescimento pessoal e profissional. Se cada um tem o que merece, parafraseando o prof., fico feliz com o que vivi e mereci durante o mestrado e doutorado. Mas não acaba aqui, obviamente.

Aos amigos dos lab Pri, Dani, Lari, Jé, Ale, Tita, Nai, Tiago, Amanda, Sheisa, Bea, Ivan, prof. Sérgio e Rafa, pelas conversas, desabafos, consultas, discussões e pelos momentos de distração, churrascos, amigos secretos, risadas e cafézinhos. Em especial a Lari, Pri, Dani, Jé e Ivan, cuja amizade levarei para o resto da vida.

Aos professores Bruno J. G. da Silva, Gilberto Abate, Júlio C. R. Azevedo, Isabel C. F. S. Jardim e Marco Grassi pelas contribuições valiosas e pelo direcionamento para o documento final. Ao professor Gilberto Abate pelas amostras de solo cedidas.

Às minhas grandes amigas desde a graduação Daniele e Danilla, por manter sempre viva a nossa amizade, mesmo com a distância. Tenho muito orgulho de tudo o que fizemos e nos tornamos.

À Sandra Stets e Marcus Liz, que me ajudaram inúmeras vezes dentro e fora do laboratório. Pelas oportunidades de trabalho que surgiram, ideias, apoio e amizade.

Às alunas de iniciação, Jé Araújo e Monize, pela dedicação e oportunidade durante os trabalhos desenvolvidos.

À Capes, ao CNPq e à Fundação Araucária pela bolsa concedida e apoio financeiro.

A todos aqueles que ajudaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho, sem os quais essa tese não seria possível.

“A raça humana está desafiada, mais do que nunca antes, a demonstrar nosso domínio,
não sobre a natureza, mas sobre nós mesmos.”

Rachel Carson

“Eu fui ensinada que o caminho do progresso não é nem rápido, nem fácil.”

Marie Curie

RESUMO

O preparo de amostra utilizando o método QuEChERS (acrônimo de *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) possibilita o isolamento de espécies de interesse em uma etapa de extração empregando acetonitrila e separação por *salting out* com NaCl e MgSO₄, seguida de uma etapa de limpeza (extração em fase sólida dispersiva, dSPE). Originalmente desenvolvida para extração de agrotóxicos em alimentos, adaptações e/ou modificações tem sido, recentemente, propostas para análise de fármacos, produtos de higiene pessoal, plastificantes e inclusive, agrotóxicos em diversas matrizes ambientais. Neste trabalho, o objetivo foi otimizar um método rápido e eficaz para a determinação de diferentes poluentes de preocupação emergentes em amostras de água superficial e em solos empregando QuEChERS modificado e a cromatografia líquida (LC) com detecção por arranjo de diodos e/ou fluorescência (LC-DAD/FLD). No método QuEChERS-LC-DAD para determinação de fármacos, hormônios e bisfenol A em matrizes aquosas, um planejamento fatorial fracionário Plackett-Burman foi empregado para identificar os principais fatores que influenciavam o método de extração, basicamente as quantidades de MgSO₄, NaCl e PSA. Essas variáveis foram posteriormente otimizadas em um planejamento composto central 2³. O método otimizado foi validado segundo as diretrizes da Diretiva da Comunidade Europeia 2002/657/EC. Curvas analíticas construídas na matriz mostraram excelente linearidade na faixa de concentração estudada ($R^2 \geq 0,9925$). Os limites de quantificação dos analitos variaram entre 1,0 e 10 µg L⁻¹. As recuperações dos analitos foram obtidas entre 65 e 123% e desvios padrão relativos (RSD) foram inferiores a 22,3%. O método validado foi aplicado em amostras de água coletadas no rio Belém (Curitiba-PR) em diferentes estações do ano. Em todas as amostras foi possível detectar a presença de cafeína (CAF) em concentrações na faixa de 40,6 a 95,2 µg L⁻¹ no ponto coletado próximo a foz do rio. Já para a modificação do método QuEChERS-LC-DAD/FLD para os agrotóxicos atrazina e seus metabólitos, desetilatraxina e desisopropilatraxina, carbaril, carbendazim e diuron, um planejamento fatorial 2⁴ foi empregado para avaliar as condições de extração do QuEChERS. 1,0 g de solo reidratado com 4,0 mL de água e extraído com 2,0 mL de acetonitrila seguido da etapa de *salting out* com 1,0 g MgSO₄ e 0,5 g NaCl apresentaram as respostas mais adequadas em termos de recuperação aparente (73 a 116%). O *clean-up* também foi investigado, sendo que 25 mg de PSA combinado com 100 mg MgSO₄ foram selecionados. O protocolo desenvolvido foi validado de acordo com as exigências do guia SANTE/11945/2015. O método apresentou linearidade na faixa de concentração investigada para todos os agrotóxicos ($R^2 \geq 0,998$) a partir de curvas analíticas construídas na matriz. As recuperações obtidas foram na faixa de 75% a 108% com RSD inferior a 20%, respectivamente. Por fim, o método foi testado frente a aplicação em amostras reais. Nenhum agrotóxico foi determinado nas amostras coletadas.

Palavras-chave: QuEChERS. Planejamento fatorial. Micropoluentes. Águas superficiais. Solo.

ABSTRACT

Sample preparation employing the QuEChERS method (an acronym for Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) allows the isolation of species in an extraction step using acetonitrile and separation by salting out with NaCl and MgSO₄, followed by a clean-up step (dispersive solid phase extraction, d-SPE). Initially, QuEChERS was developed to extract pesticides from food, and adaptations and/or modifications have recently been proposed for pharmaceuticals analysis, personal care products, plasticizers, and likewise pesticides in several environmental matrices. The purpose herein was to optimize a fast and efficient method to assess different contaminants of emerging concern in surface water and soil samples using a modified QuEChERS and liquid chromatography with a diode array and/or fluorescence detector (LC-DAD/FLD). In the QuEChERS-LC-DAD method to determine pharmaceuticals, hormones, and bisphenol A in aqueous matrices, a Plackett-Burman fractional factorial design was employed to identify the main factors that influenced the extraction method, which were the content of MgSO₄, NaCl, and PSA. These variables were subsequently optimized using a 2³ central composite design. The optimized method was validated according to the Commission Decision of the European Community 2002/657/EC. Analytical curves constructed in the matrix presented excellent linearity under the evaluated range ($R^2 \geq 0.9925$). The quantification limits of the analytes varied in the range of 1.0 and 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. The analytes recovery was achieved between 65.1 e 123% and relative standard deviations (RSD) were below 22.3%. The validated method was applied in water samples collected in Belém river (Curitiba, PR) in different seasons of the year. In all samples, it was possible to detect caffeine (CAF) in the concentration range of 40.6 to 95.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ in the water sampled from the river mouth. For the modification of the QuEChERS-LC-DAD/FLD method to the pesticides atrazine and its metabolites, deethylatrazine and deisopropilatrazine, carbaryl, carbendazim and diuron, a 2⁴ factorial design was employed to assess the extraction conditions of the QuEChERS. 1.0 g of the soil rehydrated with 4.0 mL of water and extracted with 2.0 mL of acetonitrile followed by the salting out procedure with 1.0 g of MgSO₄ and 0.5 g of NaCl presented the more suitable response regarding the apparent recovery (72.8 to 116%). The clean-up was also investigated, and 25 mg of PSA with 100 mg of MgSO₄ were selected. The developed protocol was evaluated according to the SANCO/825/00 requirements. The method presented linearity in the investigated concentration range to all pesticides ($R^2 \geq 0.998$) by using curves constructed in the matrix. The recoveries were in the range from 74.7% a 108%, and the precision lower than 20%. Finally, the method was tested upon real sample application. None of the pesticides were determined in the real samples.

Keywords: QuEChERS. Factorial design. Micropollutants. Surface water. Pesticides. Soil.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 - FLUXOGRAMA DO MÉTODO QuEChERS ORIGINAL PARA PREPARO DE AMOSTRA.....	26
FIGURA 1.2 - ESTRUTURA DO SORVENTE ETILENODIAMINO-N-PROPILSILANO (PSA). .	27
FIGURA 1.3 - PROCEDIMENTO SEQUENCIA APLICADO NA RSM.....	37
FIGURA 1.4 - REPRESENTAÇÃO DE UM PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL PARA A) 2 E B) 3 FATORES.	39
FIGURA 1.5 - EXEMPLO TÍPICO DE CURVA ANALÍTICA OBTIDA EM DETERMINADA FAIXA DE CONCENTRAÇÃO.	42
FIGURA 2.1 - LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS DE AMOSTRAGEM NO RIO BELÉM.	63
FIGURA 2.2 - CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA O MÉTODO CROMATOGRÁFICO LC-DAD OTIMIZADO EM CADA UM DOS COMPRIMENTOS DE ONDA AVALIADOS A) 254 nm, B) 270 nm e C) 280 nm (CONCENTRAÇÃO DOS ANALITOS: 100 µg L ⁻¹).	65
FIGURA 2.3 - GRÁFICOS DE PARETO PARA OS EFEITOS PRINCIPAIS (VALORES ABSOLUTOS) A PARTIR DO PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN PARA A) CAF, B) CBZ, C) CRF, D) HCT, E) BFA, F) E2, G) EE2, H) SMX E I) DZP. O NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA PARA CADA ANALITO É REPRESENTADO PELA LINHA VERTICAL VERMELHA.	68
FIGURA 2.4 - GRÁFICOS PARA INTERPRETAÇÃO GEOMÉTRICA DOS EFEITOS DE INTERAÇÃO DE TERCEIRA ORDEM DO PLANEJAMENTO CCD PARA BFA	73
FIGURA 2.5 - GRÁFICO DOS RESÍDUOS VERSUS VALORES PREVISTOS PELO MODELO LINEAR.....	74
FIGURA 2.6 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA LINEAR PARA RECUPERAÇÃO DA SMX EMPREGANDO QuEChERS EM FUNÇÃO DOS FATORES QUANTIDADE DE NaCl E PSA (QUANTIDADE DE MgSO ₄ MANTIDA NO PONTO CENTRAL).....	75
FIGURA 2.7 - OTIMIZAÇÃO DO A) VOLUME DE SOLVENTE NA ETAPA DE EXTRAÇÃO E B) VOLUME DE RECONSTITUIÇÃO EMPREGADOS NO MÉTODO QuEChERS (VOLUME DE AMOSTRA: 5,0 mL; VOLUME DE RECONSTITUIÇÃO OTIMIZADO EMPREGANDO 5,0 mL DE ACN NA ETAPA DE EXTRAÇÃO).	77
FIGURA 2.8 - FLUXOGRAMA DO MÉTODO QuEChERS OTIMIZADO PARA OS FÁRMACOS, HORMÔNIOS E BISFENOL A EM MATRIZES AQUOSAS.....	79

FIGURA 2.9 - COMPARAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA EXTRATO BRANCO E AMOSTRA FORTIFICADA ($40 \mu\text{g L}^{-1}$) APÓS EXTRAÇÃO QuEChERS EM 280 nm PARA A) P1, B) P2 E C) P3	82
FIGURA 2.10 - DESVIOS PADRÃO RELATIVO (RSD%) PARA DIFERENTES NÍVEIS DE FORTIFICAÇÃO (n=6) PARA CADA COMPOSTO PARA O ENSAIO DE REPETIBILIDADE DE A) P1 B) P2 E C) P3 COLETADAS EM NOVEMBRO-2016.	94
FIGURA 2.11 - CROMATOGRAMAS EM 280 nm OBTIDOS PARA ANÁLISE EMPREGANDO O MÉTODO QuEChERS-LC-DAD DAS CINCO CAMPANHAS AMOSTRAIS REALIZADAS EM A) P1, B) P2 E C) P3	97
FIGURA 2.12 - CROMATOGRAMAS EM 280 nm OBTIDOS PARA ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS EM P3 EMPREGANDO O MÉTODO QuEChERS-LC-DAD EM A) JULHO/2016 E B) NOVEMBRO/2016. GRÁFICO INSERIDO: COMPARAÇÃO DO ESPECTRO OBTIDO PARA CAFEÍNA NA AMOSTRA E NO PADRÃO.	100
FIGURA 3.1 - FLUXOGRAMA DO MÉTODO QuEChERS AVALIADO PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE SOLO (NÍVEL DE FORTIFICAÇÃO: $100 \mu\text{g kg}^{-1}$; n=2)	112
FIGURA 3.2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MÉTODO QuEChERS EMPREGADO NA DETERMINAÇÃO DOS RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM SOLO.....	115
FIGURA 3.3 - CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA O MÉTODO CROMATOGRÁFICO LC-DAD PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM CADA UM DOS COMPRIMENTOS DE ONDA AVALIADOS A) 215 nm, B) 220 nm, C) 254 nm, D) 280 nm, E) FLD A (λ_{EX} : 280 nm; λ_{EM} : 300 nm) E F) FLD B (λ_{EX} : 280 nm; λ_{EM} : 300 nm). CONCENTRAÇÃO DOS ANALITOS: $1,0 \text{ mg L}^{-1}$	119
FIGURA 3.4 - CROMATOGRAMA EM 280 nm OBTIDO PARA ANÁLISE DA AMOSTRA BRANCO DE SOLO ATRAVÉS DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO LC-DAD, SENDO I, II E III OS INTERFERENTES MAJORITÁRIOS	121
FIGURA 3.5 - RECUPERAÇÕES APARENTES OBTIDAS PARA AVALIAÇÃO INICIAL DO MÉTODO QuEChERS APLICADO PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE SOLO (2,0 g DE SOLO; NÍVEL DE FORTIFICAÇÃO: $100 \mu\text{g kg}^{-1}$; n=2).	122
FIGURA 3.6 - GRÁFICOS DE PARETO EM TERMOS DE VALORES ABSOLUTOS DE EFEITO PARA OS EFEITOS PRINCIPAIS E DE INTERAÇÃO OBTIDOS A PARTIR DO PLANEJAMENTO 2^4 PARA A) DIA, B) DEA, C) CBD, D) CBL, E) ATZ E F) DIU. O NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA PARA CADA ANALITO É REPRESENTADO PELA LINHA VERTICAL VERMELHA.	124
FIGURA 3.7 - GRÁFICOS PARA INTERPRETAÇÃO GEOMÉTRICA DOS EFEITOS DE INTERAÇÃO DE A) SEGUNDA E B) TERCEIRA ORDEM DO PLANEJAMENTO 2^4 PARA DIA, DEA E CBL.....	126

FIGURA 3.8 - RECUPERAÇÃO APARENTE DOS AGROTÓXICOS NA PRESENÇA DE DIFERENTES FASES SORVENTES (50 mg) NA ETAPA DE <i>CLEAN-UP</i> DO MÉTODO QuEChERS (n=3). (NÍVEL DE FORTIFICAÇÃO: 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$).	129
FIGURA 3.9 - COMPARAÇÃO DO SINAL CROMATOGRÁFICO EM A) 220 nm E B) 280 nm OBTIDO A PARTIR DO MÉTODO QuEChERS-LC-DAD/FLD NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DAS DIFERENTES FASES SORVENTES INVESTIGADAS. (S/C: SEM <i>CLEAN-UP</i>).	130
FIGURA 3.10 - INFLUÊNCIA DA QUANTIDADE DE SORVENTE NA RECUPERAÇÃO APARENTE DOS ANALITOS EM DIFERENTES NÍVEIS DE CONCENTRAÇÕES: A) 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, B) 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, C) 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ E D) 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$	132
FIGURA 3.11 - OTIMIZAÇÃO DO VOLUME DE RECONSTITUIÇÃO EMPREGADO NO MÉTODO QuEChERS PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS DE SOLO. (NÍVEL DE FORTIFICAÇÃO: 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$; VOLUME DE ACN: 5,0 mL; n=3).	134
FIGURA 3.12 - FLUXOGRAMA DO MÉTODO QuEChERS OTIMIZADO PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS E METABÓLITOS DE SOLO	135
FIGURA 3.13 - CROMATOGRAMAS TÍPICOS OBTIDOS PARA EXTRATO DE SOLO COM E SEM FORTIFICAÇÃO E SINAL DOS ANALITOS EM SOLVENTE (CONCENTRAÇÃO: 50 $\mu\text{g L}^{-1}$) EM A) 215 nm e B) FLD (λ_{EX} : 280 nm; λ_{EM} : 330 nm). NÍVEL DE FORTIFICAÇÃO EM SOLO DE 50 E 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$, RESPECTIVAMENTE	136
FIGURA 3.14 - CURVAS ANALÍTICAS DOS AGROTÓXICOS E METABÓLITOS CONSTRUÍDAS NA MATRIZ EMPREGANDO O MÉTODO QuEChERS-LC-DAD/FLD	138
FIGURA 3.15 - GRÁFICOS DE PARETO EM TERMOS DE VALORES ABSOLUTOS DE EFEITO PARA O PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN USADO PARA AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ PARA A) DIA, B) DEA, C) CBD, D) CBL, E) ATZ E F) DIU. O NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA PARA CADA ANALITO É REPRESENTADO PELA LINHA VERMELHA	144

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 - ESTRUTURA MOLECULAR E PROPRIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DOS COMPOSTOS SELECIONADOS.....	54
TABELA 2.2 - FATORES E NÍVEIS EMPREGADOS NO PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN PARA O <i>SCREENING</i> DAS VARIÁVEIS DO MÉTODO QuEChERS (VOLUME DA AMOSTRA: 7,0 mL)	57
TABELA 2.3 - MATRIZ PLACKETT-BURMAN PARA 12 ENSAIOS.....	57
TABELA 2.4 - FATORES, NÍVEIS E MATRIZ DO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL 2 ³ COM QUINTUPLICATA DO PONTO CENTRAL (VOLUME DA AMOSTRA: 5,0 mL)	58
TABELA 2.5 - FATORES, NÍVEIS E MATRIZ PARA O TESTE DE YOUNDEN NA INVESTIGAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO	61
TABELA 2.6 - FIGURAS DE MÉRITO PARA A DETERMINAÇÃO DOS FÁRMACOS, HORMÔNIOS E BISFENOL A EMPREGANDO O MÉTODO CROMATOGRÁFICO OTIMIZADO (CURVA ANALÍTICA EM SOLVENTE)	66
TABELA 2.7 - RECUPERAÇÕES OBTIDAS EMPREGANDO PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN PARA <i>SCREENING</i> DAS VARIÁVEIS DO MÉTODO QuEChERS (AMOSTRA FORTIFICADA COM 20 µg L ⁻¹ DOS ANALITOS, EXCETO HCT (45 µg L ⁻¹)).....	67
TABELA 2.8 - RECUPERAÇÕES OBTIDAS PARA OS ANALITOS EM ESTUDO NO ENSAIO DE OTIMIZAÇÃO EMPREGANDO PLANEJAMENTO 2 ³ COMPOSTO CENTRAL (AMOSTRA FORTIFICADA COM 20 µg L ⁻¹ DOS ANALITOS, EXCETO HCT (45 µg L ⁻¹) E SMX (65 µg L ⁻¹))	72
TABELA 2.9 - ANOVA PARA O MODELO LINEAR CONSTRUÍDO COM AS RECUPERAÇÕES OBTIDAS NO PLANEJAMENTO PARA SMX (CONCENTRAÇÃO DA SMX: 65 µg L ⁻¹)	73
TABELA 2.10 - PRINCIPAIS PARÂMETROS E CONDIÇÕES OTIMIZADOS PARA O MÉTODO DE EXTRAÇÃO QuEChERS EM AMOSTRAS AQUOSAS.....	79
TABELA 2.11 - RESULTADOS PARA SELETIVIDADE DO MÉTODO QuEChERS-LC-DAD (n=3) PARA AMOSTRAS COLETADAS EM JULHO-2016.....	84
TABELA 2.12 - RESULTADOS DOS TESTES DE PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE E CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA PARA P1 (n = 3) PARA AMOSTRAS COLETADAS EM AGOSTO-2017.....	86

TABELA 2.13 - RESULTADOS DOS TESTES DE PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE E CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA PARA P2 (n = 3) PARA AMOSTRAS COLETADAS EM AGOSTO-2017.....	87
TABELA 2.14 - RESULTADOS DOS TESTES DE PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE E CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA PARA P3 (n = 3) PARA AMOSTRAS COLETADAS EM AGOSTO-2017.....	88
TABELA 2.15 - LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO OBTIDOS PARA O MÉTODO QuEChERS-LC-DAD	89
TABELA 2.16 - COMPARAÇÃO DOS LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO PARA OS ANALITOS INVESTIGADOS OBTIDA EM DIFERENTES MÉTODOS	90
TABELA 2.17 - RESULTADOS PARA RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS EMPREGANDO O MÉTODO QuEChERS-LC-DAD (n=6) PARA AMOSTRAS DE ÁGUA COLETADAS EM NOVEMBRO-2016.....	93
TABELA 2.18 - PRECISÃO INTERMEDIÁRIA DOS ANALITOS EMPREGANDO O MÉTODO QuEChERS-LC-DAD (n=12) PARA AMOSTRAS EM DIFERENTES COLETAS.....	95
TABELA 2.19 - CONCENTRAÇÃO DE CAFÉINA ($\mu\text{g L}^{-1}$) DETERMINADA NAS CINCO CAMPANHAS AMOSTRAIS NO RIO BELÉM.....	98
TABELA 3.1 - ESTRUTURA MOLECULAR E PROPRIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DOS AGROTÓXICOS SELECIONADOS	105
TABELA 3.2 - FATORES, NÍVEIS E MATRIZ DO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL 2 ⁴ COM QUADRUPLICATA DO PONTO CENTRAL (NÍVEL DE FORTIFICAÇÃO: 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$).	113
TABELA 3.3 - FATORES E NÍVEIS EMPREGADOS NO PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN PARA A AVALIAÇÃO DE ROBUSTEZ DO MÉTODO QuEChERS EM SOLO.....	117
TABELA 3.4 - RESULTADOS DAS ANÁLISES QUÍMICA E GRANULOMÉTRICA DO SOLO E INDICAÇÃO DA CLASSE TEXTURAL, DOS HORIZONTES AVALIADOS DO SOLO NA ÁREA EXPERIMENTAL	117
TABELA 3.5 - FIGURAS DE MÉRITO PARA A DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS AGROTÓXICOS POR LC-DAD/FLD.....	120
TABELA 3.6- RECUPERAÇÕES APARENTES OBTIDAS PARA OS ANALITOS EM ESTUDO NO ENSAIO DE OTIMIZAÇÃO EMPREGANDO PLANEJAMENTO 2 ⁴ (AMOSTRA FORTIFICADA COM 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ DOS ANALITOS)	123
TABELA 3.7 - RESULTADOS DOS TESTES DE PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE E CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA PARA AMOSTRAS DE SOLO (n = 6)	139

TABELA 3.8 - RESULTADOS PARA RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS EMPREGANDO O MÉTODO QuEChERS-LC-DAD/FLD EM SOLOS (n=5)	141
TABELA 3.9 - RECUPERAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DOS AGROTÓXICOS E METABÓLITOS DA ATZ EM AMOSTRAS REAIS DE SOLO EMPREGANDO O MÉTODO QuEChERS-LC-DAD/FLD EM SOLOS (n=5).....	146

LISTA DE SIGLAS

ACN	- Acetonitrila
ANOVA	- Análise de Variância
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	- Association of Official Analytical Chemists
ASE	- <i>Accelerated Solvent Extraction</i>
ATZ	- Atrazina
BFA	- Bisfenol A
CAF	- Cafeína
CBD	- Carbendazim
CBL	- Carbaril
CBZ	- Carbamazepina
CCD	- <i>Central Composite Design</i>
CE	- contaminantes emergentes
CEC	- <i>Contaminants of Emerging Concern</i>
CRF	- Cloranfenicol
CRM	- <i>Certified Reference Material</i>
CV	- Coeficiente de Variação
DAD	- <i>Diode Array Detector</i>
DEA	- Desetilatrazina
DIA	- Desisopropilatrazina
DIU	- Diuron
DLLME	- <i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>
d-SPE	- <i>dispersive Solid Phase Extraction</i>
DZP	- Diazepam
E2	- 17 β -estradiol
EC	- <i>European Commission</i>
EDC	- <i>Endocrine Disrupting Chemical</i>
EE2	- 17- α -etinilestradiol
ETE	- Estação de Tratamento de Esgoto
EURACHEM	- Comitê Europeu para Análise Química
FCL -	- Faixa de Concentração Linear
FLD	- <i>Fluorescence Detector</i>
FM	- Fase móvel
GC	- <i>Gas Chromatography</i>
GCB	- <i>Graphitized Carbon Black</i>
GC-MS	- <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>
HCT	- Hidroclorotiazida
HPLC	- <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICH	- <i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
INMETRO	- Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IUPAC	- <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
K _{oc}	- Coeficiente de sorção no solo
K _{ow}	- Coeficiente de partição octanol-água

LC	- <i>Liquid Chromatography</i>
LC-MS/MS	- <i>Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry</i>
LLE	- <i>Liquid-Liquid Extraction</i>
LOD	- <i>Limit of Detection</i>
LOQ	- <i>Limit of Quantification</i>
LOQ _i	- <i>Limit of Quantification instrumental</i>
MAE	- <i>Microwave Assisted Extraction</i>
MeOH	- <i>Metanol</i>
MMQO	- <i>Método dos Mínimos Quadrados Ordinários</i>
MQ _{ep}	- <i>Média Quadrática do erro puro</i>
MQ _{faj}	- <i>Média Quadrática da falta de ajuste</i>
MQ _R	- <i>Média Quadrática da regressão</i>
MQ _r	- <i>Média Quadrática dos resíduos</i>
MSPD	- <i>Matrix Solid Phase Dispersion</i>
PhAC	- <i>Pharmaceutical Active Compound</i>
PI	- <i>Padrão Interno</i>
PLE	- <i>Pressurized Liquid Extraction</i>
PVDF	- <i>Polyvinylidene Difluoride</i>
QuEChERS	- <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>
R ²	- <i>Coeficiente de determinação</i>
RSD	- <i>Relative Standard Deviation</i>
RSM	- <i>Response Surface Methodology</i>
SALLE	- <i>Salting out Assisted Liquid-Liquid Extraction</i>
SANCO	- <i>Comission of the European Communities</i>
SMX	- <i>Sulfametoxazol</i>
SPE	- <i>Solid Phase Extraction</i>
SPME	- <i>Solid Phase Microextraction</i>
t _{1/2}	- <i>Tempo de meia-vida</i>
t _R	- <i>Tempo de retenção</i>
UHPLC-MS/MS	- <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry</i>
USE	- <i>Ultrassound Extraction</i>
USEPA	- <i>United States Environmental Protection Agency</i>
UV	- <i>Ultra-violeta</i>
WHO	- <i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

	PREFÁCIO	20
	CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL	21
1.1	PREPARO DE AMOSTRAS	21
1.1.1	QuEChERS	25
1.2	PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS	32
1.2.1	Planejamento Plackett-Burman (P-B).....	33
1.2.2	Planejamento fatorial 2 ^k	35
1.2.3	Metodologia de superfície de resposta e Planejamento Composto Central.....	36
1.3	PARÂMETROS DE MÉRITO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	40
1.3.1	Seletividade	41
1.3.2	Linearidade.....	42
1.3.4	Exatidão.....	44
1.3.3	Precisão.....	46
1.3.5	Limites de detecção e quantificação.....	47
1.3.6	Robustez	48
	CAPÍTULO 2 ANÁLISE MULTICLASSE DE CONTAMINANTES DE PREOCUPAÇÃO EMERGENTE EM ÁGUAS SUPERFICIAIS USANDO QuEChERS-LC-DAD	49
2.1	INTRODUÇÃO	49
2.1.1	Fármacos.....	50
2.1.2	Hormônios e Bisfenol A.....	51
2.2	MATERIAIS E MÉTODOS	54
2.2.1	Reagentes e materiais	54
2.2.2	Preparo das soluções.....	55
2.2.3	Condições cromatográficas	56
2.2.4	Otimização do método QuEChERS.....	57
2.2.5	Validação do método QuEChERS-LC-DAD	59
2.2.6	Amostras reais	62
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
2.3.1	Otimização das condições cromatográficas	64

2.3.2	Otimização do método QuEChERS via planejamento fatorial	66
2.3.3	Validação do método.....	81
2.3.3.1	Estabilidade.....	81
2.3.3.2	Seletividade.....	81
2.3.3.3	Linearidade	85
2.3.3.4	LOD e LOQ	89
2.3.3.5	Exatidão.....	91
2.3.3.6	Precisão.....	94
2.3.3.7	Robustez	96
2.3.4	Aplicação do método.....	96
2.4	CONCLUSÕES	101
	CAPÍTULO 3 DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM SOLO EMPREGANDO QuEChERS MODIFICADO E LC-DAD/ FLD	103
3.1	INTRODUÇÃO	103
3.1.1	Agrotóxicos selecionados para o estudo.....	104
3.1.2	Determinação dos agrotóxicos selecionados em solo empregando QuEChERS.....	107
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	109
3.2.1	Reagentes e equipamentos.....	109
3.2.2	Preparo das soluções.....	110
3.2.3	Condições cromatográficas	110
3.2.4	Preparo das amostras de solo	111
3.2.5	Otimização do método QuEChERS.....	112
3.2.6	Validação do método QuEChERS-LC-DAD	114
3.2.7	Aplicação do método desenvolvido em amostras reais.....	117
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	118
3.3.1	Otimização das condições cromatográficas	118
3.3.2	Otimização do método QuEChERS para extração de agrotóxicos de solo ..	120
3.3.4	Validação do método.....	136
3.3.4.1	Seletividade.....	136
3.3.4.2	Linearidade	137

3.3.4.3	Exatidão e Precisão	141
3.3.4.4	Robustez	143
3.3.5	Aplicação do método.....	145
3.4	CONCLUSÕES	147
4	CONCLUSÃO GERAL	149
	REFERÊNCIAS	150

PREFÁCIO

O presente trabalho foi dividido em três capítulos. No capítulo 1 está reportado a revisão bibliográfica dos principais conceitos aplicados e uma visão geral crítica do QuEChERS como método de preparo de amostra em Química Analítica Ambiental.

O Capítulo 2 aborda o desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica baseada no método QuEChERS para a determinação de contaminantes de preocupação emergentes (CEC, também conhecidos como contaminantes emergentes) em águas superficiais de um rio da região de Curitiba-PR. A principal modificação introduzida nesse caso foi a utilização de amostras líquidas, otimização do processo de extração através de planejamentos fatoriais e possibilidade de pré-concentração.

O Capítulo 3, por sua vez, engloba a modificação do método QuEChERS para extração multiclasse de agrotóxicos em solos do estado do Paraná. Nesse caso, a redução da quantidade de amostra e inserção da pré-concentração foram as principais alterações realizadas em relação ao método original. Cabe aqui ressaltar que a determinação dos compostos selecionados foi realizada empregando cromatografia em fase líquida com detecção por arranjo de diodos e/ou fluorescência, que pode sofrer grande influência dos componentes de ambas matrizes selecionadas. Dessa forma, o *clean-up* do método QuEChERS é essencial na determinação dos analitos nessas matrizes ambientais.

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 PREPARO DE AMOSTRAS

O preparo de amostra é parte essencial de um método analítico. Consiste, geralmente, em um conjunto numeroso de etapas com a finalidade de que a amostra se torne apropriada para análise podendo incluir: dissolução, extração do analito de uma matriz complexa, concentração de um analito a um nível dentro dos limites de determinação, conversão química do analito a uma forma detectável e remoção ou mascaramento de interferentes (HARRIS, 2008).

Apesar de Smith (2003) relatar que a área de preparo de amostra era negligenciada em comparação ao desenvolvimento das técnicas cromatográficas até então, pode-se dizer que grande evolução foi vista nos últimos 15 anos, sendo reconhecida como uma importante etapa no desenvolvimento de um método analítico. Com o crescimento das demandas na análise química, o preparo de amostra se tornou, gradualmente, a maior parte da análise, tomando até 80% do processo analítico total (CHEN et al., 2008).

Todo avanço analítico das técnicas de separação em relação a capacidade de detecção pode ser perdido caso um método de preparo de amostra inadequado seja empregado previamente à análise (SMITH, 2003). No caso do preparo de amostras para determinações por cromatografia líquida (LC) ou cromatografia gasosa (GC), é primordial que os interferentes da matriz sejam removidos por dois motivos principais: longevidade do sistema cromatográfico como um todo e melhora do sinal analítico de uma substância de interesse (JARDIM, 2010).

A escolha da metodologia mais adequada para o preparo de amostra depende fortemente do tipo de matriz em que a amostra se encontra, bem como as propriedades físico-químicas dos analitos alvo como, por exemplo, solubilidade e coeficiente de partição, além de suas concentrações (TANKIEWICZ; FENIK; BIZIUK, 2011).

A análise direta de contaminantes de preocupação emergente (CEC) tais como fármacos, desreguladores endócrinos e agrotóxicos em matrizes ambientais, que vão desde águas subterrâneas a solo e sedimento, é bastante complexa e, muitas vezes, impraticável, necessitando de um adequado preparo de amostra. Dentre os

procedimentos modernos usualmente empregados em matrizes ambientais sólidas e líquidas já existem uma série de artigos de revisão no que se refere a extração em fase sólida (GILART et al., 2014), extração por solvente pressurizado (SUBEDI et al., 2015), extração assistida por micro-ondas (SANCHEZ-PRADO et al., 2015), ultrassom (ALBERO et al., 2015), dispersão da matriz em fase sólida (BARKER, 2012) e técnicas miniaturizadas como microextração em fase sólida (SOUZA-SILVA et al., 2015), microextração líquido-líquido dispersiva (PRIMEL et al., 2017) e extração em barra sortiva (CAMINO-SÁNCHEZ et al., 2014).

A técnica clássica de extração líquido-líquido (LLE, do inglês *liquid-liquid extraction*), fundamentada na partição entre dois líquidos imiscíveis, foi, durante muitos anos, a técnica mais empregada para o preparo de amostras líquidas ou solúveis por apresentar simplicidade experimental, baixo custo e pela possibilidade de variar a seletividade de acordo com o solvente selecionado (BARTH et al., 2015). Por empregar grandes volumes de solventes de toxicidade moderada a alta (tolueno, clorofórmio, tetraclorometano, hexano, entre outros), possibilidade de formação de emulsões e ser de difícil automação, a tendência foi a substituição da LLE por técnicas mais modernas como a extração em fase sólida (SPE) e microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) (BARTH et al., 2015). Apesar disso, o uso da LLE ainda é reportado na literatura (LIU et al., 2015).

A SPE, baseada na extração por sorção, é uma das principais técnicas empregadas no preparo de amostra quando a etapa de concentração é praticamente obrigatória (JARDIM, 2015). Consiste basicamente na passagem da matriz aquosa por um cartucho contendo sorvente e, posteriormente, os analitos retidos nessa fase são eluídos. Entre as principais vantagens da SPE estão simplicidade, flexibilidade, alta seletividade, automação, rapidez, maiores fatores de concentração e ausência de emulsão, além da possibilidade do uso de diferentes fases sorventes (ANDRADE-EIROA et al., 2016). As aplicações encontradas na literatura são inúmeras e abrangem diversos tipos de amostra, modificações das condições da SPE e concentração dos compostos analisados (DE LIZ et al., 2017; HOU et al., 2014; PATROLECCO et al., 2013).

Algumas das formas miniaturizadas de ambas as técnicas apresentadas anteriormente, a DLLME e a microextração em fase sólida (SPME), também são amplamente empregadas para a determinação de compostos de interesse ambiental (SPME: (BIELSKÁ; ŠMÍDOVÁ; HOFMAN, 2014; BONANSEA; AMÉ; WUNDERLIN,

2013; ĐUROVIĆ; ĐORĐEVIĆ, 2012; HUANG et al., 2015), DLLME: (LEONG; HUANG, 2009; ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, 2010)).

Na DLLME, uma mistura de solvente extrator e dispersor, imiscível e miscível na amostra, respectivamente, são dispersos dentro de uma amostra aquosa, constituindo um sistema de fases ternário. Assim, a mistura obtida pela rápida injeção da mistura promove a dispersão do solvente na forma de microgotas, elevando a área de contato onde ocorre a partição (ZANELLA et al., 2015). Os maiores benefícios desta técnica consistem na utilização de pequenos volumes de solventes (de μL a mL), baixo custo e rapidez. A principal desvantagem é quanto à escolha do solvente extrator, o qual além de ser capaz de extrair os compostos de interesse, possuir baixa solubilidade em água e ser miscível com solvente dispersor, deve ser compatível com a técnica analítica a ser empregada (PRIMEL et al., 2017).

Na SPME, uma fibra de sílica fundida é revestida com um filme fino de material sorvente, que é exposta na amostra aquosa ou *headspace* por um determinado tempo. Após a extração, um dos modos de dessorção da fibra é a inserção no injetor do cromatógrafo a gás, onde ocorre a dessorção térmica dos analitos. A SPME é considerada uma técnica rápida e operacionalmente simples, com reduzida manipulação da amostra, e não necessita, a princípio, a participação de solventes (AUGUSTO et al., 2015). Em contraste com as técnicas de LLE e SPE, ditas como exaustivas, as técnicas miniaturizadas, em geral, são consideradas como não-exaustivas, pois estão baseadas no equilíbrio de partição dos analitos entre a amostra e a fase extratora (MITRA, 2003).

Para matrizes ambientais sólidas, como solo e sedimento, por exemplo, as técnicas de extração por solvente pressurizado (PLE), extração assistida por micro-ondas (MAE), assistida por ultrassom (USE) e dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) são mais empregadas (PLE: (NIETO et al., 2007); MAE: (MADEJ, 2009; SANCHEZ-PRADO et al., 2015); USE: (AMADORI et al., 2013); MSPD: (RALLIS et al., 2012; SÁNCHEZ-BRUNETE et al., 2010)).

Na técnica PLE, conhecida também como extração acelerada por solvente (ASE), a amostra e o solvente são colocados em uma cela fechada e submetidas à alta pressão (500 a 3000 psi). Com a pressão e temperatura elevadas, a solubilidade dos analitos aumenta, há redução da tensão superficial do solvente que favorece sua permeação pela amostra, aumentando a taxa de extração (SUBEDI et al., 2015). As vantagens do uso de PLE são a redução do tempo e da quantidade de solvente para

o preparo de amostra. Entretanto, ainda se faz necessário uma etapa de *clean-up* (limpeza) da amostra. Além disso, as altas temperaturas podem causar decomposição dos analitos (DIMPE; NOMNGONGO, 2016).

A MAE envolve o uso de energia de micro-ondas (radiação não-ionizante com frequência de 0,3 a 300 GHz) para irradiar uma amostra em contato com o solvente, colocados em frascos abertos ou fechados, levando a tempos curtos de extração (SANCHEZ-PRADO et al., 2015). A principal desvantagem é a seleção do tipo de solvente, que deve apresentar alta constante dielétrica para absorver a energia de micro-onda.

A técnica de MSPD consiste em misturar um suporte sólido adsorvente, geralmente, utilizando sílicas com fase ligada, como C8 e C18, ou ainda Florisil, com uma amostra viscosa, sólida ou semi-sólida. A mistura homogênea é então transferida para uma coluna, na qual um solvente apropriado promove a eluição dos analitos de forma similar a SPE (BARKER, 2012). O suporte sólido, também chamado de adsorvente ou dispersante, além de interagir com o analito, realiza a quebra da arquitetura geral da amostra (dispersão), aumentando a área superficial entre o material adsorvente e o analito aprisionado na matriz (DÓREA, 2015). As principais vantagens são o emprego de menores quantidade de amostra e solvente, além da possibilidade de realizar a extração de amostras viscosas e com material particulado, impraticável quando realizado por SPE. Entretanto, a menor quantidade de amostra pode levar a uma diminuição na detectabilidade analítica. Outra limitação é quanto a reprodutibilidade da técnica em relação a alguns parâmetros como pressão aplicada na homogeneização, grau de homogeneidade e teor de umidade da amostra (DÓREA, 2015).

Diante das inúmeras formas de execução do preparo de amostra ambientais, nota-se que algumas dessas técnicas possuem uma aplicação limitada e/ou restrita. Ainda, possuem, em sua maioria, um elevado tempo de execução e de alto custo, além de serem produzidas consideráveis quantidades de resíduos.

Nos últimos anos, uma tendência em Química Analítica tem sido o desenvolvimento de técnicas de preparo de amostra multirresíduo, as quais têm a finalidade de determinar o maior número possível de compostos, com o menor tempo de análise possível e a menor geração de resíduos (FARRÉ et al., 2012). Para enfrentar este desafio e melhorar as propostas analíticas para análise de amostras complexas, além das técnicas miniaturizadas, novas tendências no preparo de

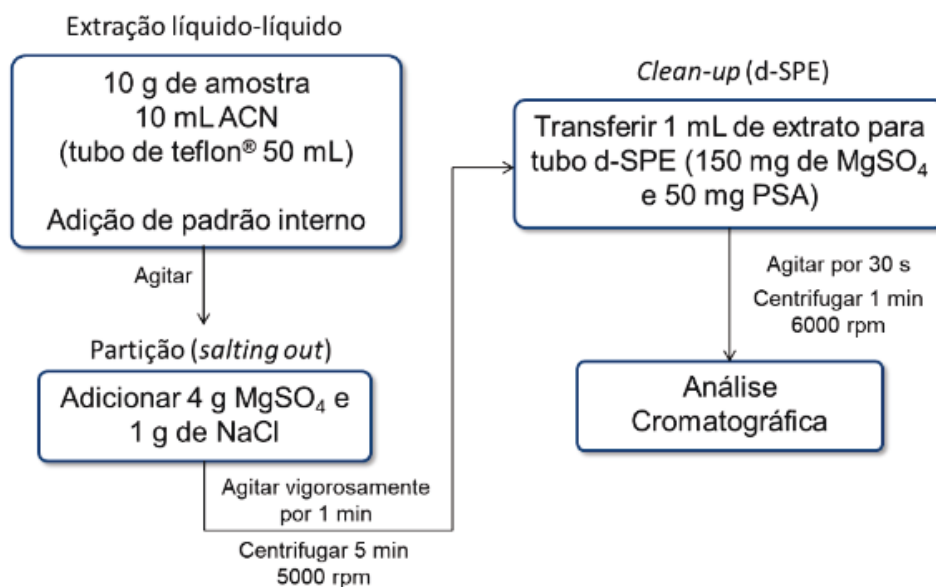
amostra como o método QuEChERS (acrônimo do inglês **Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe**), apresentaram performance satisfatória nos últimos anos.

1.1.1 QuEChERS

O método QuEChERS possibilita a extração e isolamento de espécies de interesse da matriz em poucas etapas, com quantidade mínima de solvente e foi proposto por Michelangelo Anastassiades et al. em 2003. O método QuEChERS surgiu para superar limitações existentes nos métodos multirresíduo de extração de agrotóxicos em alimentos (método de Mills e de Luke), os quais empregavam grandes quantidades de amostra e solvente e elevado número de etapas, que acarretavam em análise de elevado custo com grandes probabilidades de erros (ZANELLA et al., 2015). O intuito inicial era que o método QuEChERS fosse um procedimento dinâmico com simplicidade experimental, capaz de ser empregado em qualquer laboratório sem sacrificar o resultado analítico (ANASTASSIADES et al., 2003).

Combinando três etapas sequenciais, extração com acetonitrila, partição por *salting out* e o *clean-up* por extração em fase sólida dispersiva (d-SPE), o QuEChERS fornece uma amostra limpa para a análise cromatográfica. A primeira etapa faz uso de acetonitrila para extração das espécies de interesse, seguida de uma etapa de partição líquido-líquido pela adição dos sais $MgSO_4$ e $NaCl$. Após centrifugação, a remoção da água residual e a limpeza da amostra são realizadas simultaneamente empregando uma etapa d-SPE, na qual uma fase sorvente (PSA, do inglês, *Primary Secondary Amine*, que se trata de uma sílica modificada com grupos amino primários e secundários) combinada com $MgSO_4$ é empregada (ANASTASSIADES et al., 2003). A Figura 1.1 mostra um fluxograma do QuEChERS original.

FIGURA 1.1 - FLUXOGRAMA DO MÉTODO QUECHERS ORIGINAL PARA PREPARO DE AMOSTRA.



FONTE: Adaptado de (PRESTES et al., 2009)

A utilização de acetonitrila como solvente apresenta uma série de vantagens:

- 1) extração de menores teores de coextrativos lipofílicos como ceras, gorduras e pigmentos da matriz (GONZÁLEZ-CURBELO et al., 2015);
- 2) solubilidade da ACN em água. Uma vez que foi desenvolvida para amostras de alimentos com até 95% de água na sua constituição, a solubilidade da ACN em água foi fator importante na extração dos analitos, devido a uma maior penetração do solvente na amostra. Dessa forma, para amostras secas ou com baixo teor de água, recomenda-se a adição de água no sistema;
- 3) proporciona a extração de uma ampla faixa de analitos com diferentes polaridades e, quando acidificada, proporciona extrações adequadas para analitos que apresentam problemas de estabilidade (PRESTES et al., 2009);
- 4) é compatível com os sistemas cromatográficos, embora apresente um grande volume de expansão durante sua vaporização nas análises por GC (GONZÁLEZ-CURBELO et al., 2015).

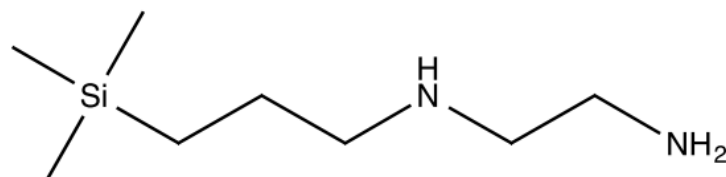
Em relação a proporção amostra/solvente, os autores mostraram que a proporção de 1:1 foi suficiente e adequada para uma extração quantitativa, sem envolver etapa de evaporação (ANASTASSIADES et al., 2003).

Na etapa de partição, uma série de sais comumente utilizados em métodos de preparo de amostra (MgSO_4 , MgCl_2 , NaNO_3 , NaCl , Na_2SO_4 , LiCl , além de frutose), foram testados por Anastassiades et al. (2003). O MgSO_4 apresentou as maiores

recuperações para os analitos e um aumento significativo na camada superior de ACN, com menor concentração da mesma em água. Uma possível explicação é que os ânions dissolvidos, principalmente o SO_4^{2-} , apresentam alta densidade de carga, atuando na expulsão dos analitos por um mecanismo combinado de repulsão eletrostática e aumento do efeito hidrofóbico. Como neste caso o estado de solvatação é entropicamente desfavorecido, os analitos se agregam e saem da fase aquosa (HYDE et al., 2017). No caso do NaCl, apesar de não apresentar recuperações satisfatórias quando empregado sozinho, o uso combinado com MgSO_4 proporcionou uma redução dos componentes da matriz co-extraídos (ANASTASSIADES et al., 2003).

A limpeza dos extratos é, sem dúvida, essencial para garantir a longevidade dos componentes cromatográficos, uma vez que compostos da matriz podem ficar aderidos no sistema, diminuindo a robustez e confiabilidade dos resultados (ZANELLA et al., 2015). Uma proposta muito simples para realizar o *clean-up* e secagem simultânea do extrato foi proposta por Anastassiades et al. (2003) e denominada de extração em fase sólida dispersiva (d-SPE), na qual certa quantidade de sorvente e MgSO_4 foram adicionados a 1 mL do extrato. A função do sorvente é remover possíveis coextrativos da matriz. Esta técnica pode ser comparada a MSPD, entretanto, o sorvente é adicionado no extrato e não diretamente na amostra. Quando comparada com a SPE tradicional, menor quantidade de sorvente é necessária, reduzindo os custos da análise, e um número reduzido de etapas é realizado, na ausência de cartuchos (ANASTASSIADES et al., 2003). O principal sorvente testado pelos autores e que propiciou a remoção efetiva de componentes polares da matriz, como ácidos graxos, outros ácidos orgânicos, açúcares e pigmentos, foi a PSA (Figura 1.2).

FIGURA 1.2 - ESTRUTURA DO SORVENTE ETILENODIAMINO-N-PROPILSILANO (PSA).



Este sorvente atua como um trocador aniônico e pode interagir com outros compostos da matriz através de ligações de hidrogênio ou dipolo-dipolo (ZANELLA et

al., 2015). Por causa da formação rápida das ligações de hidrogênio, o *clean-up* está completo depois de poucos segundos de agitação (ANASTASSIADES et al., 2003). Além disso, os grupos amino primário e secundário conferem caráter de estrutura bidentada ao PSA, podendo apresentar um elevado efeito quelante.

Além disso, a etapa de d-SPE é considerada extremamente versátil uma vez que diferentes tipos de sorventes, como, por exemplo, C18 e carbono grafitizado, e suas misturas podem ser empregados (ZANELLA et al., 2015).

Outros dois métodos QuEChERS oficialmente utilizados são: o método da *European Standard EN 15662* e o da *AOAC 2007.01*. No primeiro caso, além do NaCl e MgSO₄ são utilizados sais de citrato tamponantes e menor quantidade de PSA (25 mg). Para o segundo caso, 1% de ácido acético é adicionado juntamente com a acetonitrila, o NaCl é substituído por acetato de sódio e outros sorventes foram acrescentados na fase de *clean-up* como C18 e carvão grafitizado (SCHMIDT; SNOW, 2016).

As modificações introduzidas no método QuEChERS proposto originalmente aumentaram a aplicabilidade do método frente a grande variedade de analitos e matrizes passíveis de estudo.

1.1.1.1 Modificações no método QuEChERS

Embora o método QuEChERS seja aplicado com sucesso para análises multirresíduo de agrotóxicos em alimentos se mostrando um procedimento rápido, de baixo custo, com menor consumo de solventes e que mantém a robustez necessária, ajustes subsequentes para melhorar o desempenho do método, muitas vezes, são necessários.

O desenvolvimento e a investigação do método QuEChERS envolve um grande número de variáveis, sendo indispensável o conhecimento da influência dessas variáveis na resposta a ser avaliada. As quantidades e tipos de solvente e amostra, composição do *salting out*, pH, agitação e centrifugação, são alguns dos fatores que podem variar durante a etapa de extração. Para o *clean-up*, por sua vez, os materiais sorventes devem ser selecionados de acordo com a possibilidade de eliminação de interferentes presentes na amostra. É importante observar que apesar de existirem indicações na literatura e métodos oficiais em relação às quantidades de reagentes a serem utilizadas no método QuEChERS, a otimização de cada passo é

fundamental para a adequação dos parâmetros do método à matriz e aos analitos em estudo (SCHMIDT; SNOW, 2016).

O método QuEChERS tem sido adaptado e/ou modificado para análise de: outros tipos de analitos como fármacos e alguns desreguladores endócrinos (BOURDAT-DESCHAMPS et al., 2014; CERQUEIRA; CALDAS; PRIMEL, 2014; KARAGEORGOU; SAMANIDOU, 2011; MACHADO et al., 2013), hormônios (PEYSSON; VULLIET, 2013), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (CVETKOVIC et al., 2016), e também aplicados em diversas matrizes ambientais, tais como água (BRONDI et al., 2011; SHI et al., 2012; WU et al., 2013), sedimento (BERLIOZ-BARBIER et al., 2014; BRONDI et al., 2011; CZECH et al., 2016), solo (BRAGANÇA et al., 2012; CVETKOVIC et al., 2016; ROUVIRE et al., 2012; SALVIA; CREN-OLIVÉ; VULLIET, 2013).

Cerqueira et al. (2014) propuseram um protocolo de extração empregando QuEChERS e análise por LC-MS/MS para determinação dos principais representantes de algumas classes de CEC (agrotóxicos, fármacos e produtos de higiene pessoal) em lodo de estação de tratamento de água. Os autores relataram a utilização de quitina na etapa de SPE dispersiva. Com o método otimizado, recuperações na faixa de 50-120% foram obtidas, com RSD de 15% e LQ entre 1,0 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Metilparabeno (preservativo empregado em produtos de higiene pessoal) e tebuconazol (agrotóxico utilizado em plantações de arroz) foram encontrados nas amostras reais analisadas em concentrações abaixo do LOQ (CERQUEIRA et al., 2014).

Também em 2014, Berlioz-Barbier et al. otimizaram um método por LC-MS/MS para determinação de fármacos, agrotóxicos, produtos de higiene pessoal e plastificantes em sedimento do rio Bourbre (França). O método QuEChERS empregado foi modificado com tampão acetato na etapa de extração e PSA/GCB foram utilizados na etapa de *clean-up*. O método validado proporcionou recuperações entre 40 e 98 % para os analitos alvo (BERLIOZ-BARBIER et al., 2014).

As modificações podem ocorrer em ambas etapas como proposto por Cvetkovic et al. (2016). Os autores avaliaram a extração de HPA do solo, modificando o solvente de extração (de acetonitrila para hexano) e também testaram diversos sorventes como florisil, terra diatomácea e uma zeólita, além dos convencionais, PSA e C18. Considerando todos os ensaios realizados, os autores encontraram recuperações mais adequadas quando a extração foi conduzida com acetonitrila como

solvente de extração e terra diatomácea como sorvente na etapa de *clean-up*. Tal combinação garantiu uma menor interferência de coextrativos e baixo sinal de fundo (*background*).

Portanto, existem inúmeras formas de modificação do método QuEChERS já relatadas na literatura. Entretanto, visto a potencialidade do método e as modificações já realizadas, ainda existe possibilidade de aplicação de novas fases sorventes, miniaturização e automação.

1.1.1.2 Aplicação do Método QuEChERS em água e solo

A extração de poluentes orgânicos de amostras ambientais como solo, sedimento e água empregando o QuEChERS já é uma realidade, tanto que algumas revisões sobre o tema já foram publicadas (DE CARLO et al., 2015; PSZCZOLIŃSKA; MICHEL, 2016; SCHMIDT; SNOW, 2016).

O método QuEChERS proporciona excelentes taxas de recuperação para analitos de classes e propriedades físicoquímicas distintas, além da eficiente eliminação de interferentes empregando os mais diversos sorventes na etapa de extração em fase sólida dispersiva. A associação do método QuEChERS com técnicas cromatográficas com detecção por espectrometria de massas tem sido bem-sucedida até o presente momento. A alta seletividade e a detectabilidade da espectrometria de massas reduziram significativamente os problemas com os compostos de matriz interferentes. No entanto, uma vez que o detector MS é sensível à matriz podendo apresentar supressão ou aumento da ionização, geralmente, é necessária uma limpeza antes da determinação cromatográfica, sendo o método QuEChERS uma alternativa muito simples para isto.

Os métodos para determinação de agrotóxicos em solo estão significativamente mais presentes que para poluentes orgânicos em água. Lesueur et al. (2008) desenvolveram um método QuEChERS para determinação de 24 agrotóxicos em solo por GC-MS e LC-MS/MS. 10 g de amostra foram extraídas com 20 mL de ACN, com partição empregando 4,0 g MgSO₄ e sais de citrato de sódio diidratado e hidrogenocitrato dissódico sesquidratado. O *clean-up* foi realizado com 150 mg de PSA e 950 mg de MgSO₄. A recuperação média dos agrotóxicos foi obtida na faixa de 27,3 a 120,9% com limites de detecção na faixa de 0,02 a 88 µg kg⁻¹ (LESUEUR et al., 2008).

Caldas et al. (2011) propuseram a determinação de múltiplas classes de agrotóxicos em solo de lavoura de arroz empregando QuEChERS e LC com espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS). As condições do QuEChERS testadas foram a adição de sais na partição, acidificação das amostras com ácido acético, uso de tampão e na etapa de *clean-up*, avaliaram PSA e C18. A principal alteração em relação ao método original foi a acidificação da acetonitrila, procedimento que aumentou a estabilidade dos analitos em ACN. A recuperação obtida nos níveis de fortificação de 10 a 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ foram entre 70,3 e 120% com RSD menor que 18,2%. O método validado aplicado em amostras reais permitiu quantificar tebuconazol e fipronil em concentrações entre 10 e 182 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (CALDAS et al., 2011).

Em um método QuEChERS simplificado, Mei et al. (2011) propuseram um procedimento para análise de cinco agrotóxicos em solo e análise por LC-MS/MS. A inovação no método se deu na unificação das etapas de extração e *clean-up*, usualmente realizadas em tubos diferentes. Dessa forma, o QuEChERS foi realizado em um único passo sequencial, empregando como sorventes PSA/C18 na proporção de 1:1. Taxas de recuperação foram observadas na faixa de 75 a 95% para os analitos estudados, com limites de quantificação 0,017–0,067 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (MEI; DU; CEN, 2011).

Brondi et al. (2011), desenvolveram um método QuEChERS para a determinação de quatro agrotóxicos em água e sedimento com análise por GC-MS. Os autores empregaram as mesmas condições propostas inicialmente por Anastassiades et al. (2003) sem otimizá-las para seu sistema. Ainda, a etapa de *clean-up* foi realizada em um cartucho convencional de extração em fase sólida contendo PSA, C18 e MgSO_4 . As recuperações obtidas para os agrotóxicos em água foi entre 63 e 116% sendo o RSD inferior a 12%. Os limites de detecção obtidos em água foram de até 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (BRONDI et al., 2011).

Além dos métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas salientados, mais recentemente, alguns autores propuseram a associação do método de extração QuEChERS com LC acoplados aos detectores por arranjo de diodos (DAD) e de fluorescência (FLD) (BEDASSA; GURE; MEGERSA, 2015; DE CARLO et al., 2015; MACHADO et al., 2013; REJCZAK; TUZIMSKI, 2017; TUZIMSKI; REJCZAK, 2016).

A maioria dos trabalhos salientados empregaram esse tipo de detecção para amostras de alimentos. Apenas um trabalho otimizou um método QuEChERS para

determinação de agrotóxicos em solo e análise por LC-UV (DE CARLO et al., 2015). As principais desvantagens associadas ao uso de QuEChERS e análise por LC-DAD e FLD são a elevada interferência no sinal analítico, altos limites de detecção (RAHMAN et al., 2017), além de serem considerados detectores não-universais. Apesar disso, a partir de modificações e otimização do método de preparo de amostra, é possível superar tais dificuldades e adequar as respostas aos níveis de concentração esperado em amostras ambientais complexas.

1.2 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

Uma das vertentes da quimiometria, um dos quatro grandes pilares da química analítica, é a otimização e estudo de condições experimentais via planejamento fatorial (PEREIRA FILHO, 2015). Geralmente, ferramentas estatísticas são empregadas na análise de resultados experimentais, no entanto, importância deve ser dada a aplicação de tais conceitos antes e durante a execução de experimentos (MILLER; MILLER, 2010). A maioria das estratégias de otimização para métodos analíticos ainda avaliam uma variável por vez (*one-at-a-time*). Esse método é bastante ineficiente, pois, na maioria dos casos, não atingem a resposta ideal procurada uma vez que as interações entre os fatores analisados não são considerados (LI et al., 2016).

Duas qualidades devem estar presentes em um bom método de otimização: fornecer a resposta ideal ou pelo menos próxima ao ideal e atingi-lo com o menor número de etapas possíveis (MILLER; MILLER, 2010). Como, via de regra, o desenvolvimento e a investigação de um método dependem de um grande número de variáveis, é indispensável o conhecimento da influência dessas variáveis na resposta a ser avaliada (MONTGOMERY, 2012; RODRIGUES; IEMMA, 2014).

A escolha do planejamento adequado depende diretamente do número de variáveis envolvidas, viabilidade do número de ensaios, disponibilidade de matéria-prima e logicamente do custo do processo em estudo. Existem diversas estratégias para o delineamento experimental: planejamento fracionário ou de Plackett-Burman para seleção de variáveis quando os fatores são muitos ou o conhecimento do processo é pequeno; planejamento fatorial completo, usualmente para 2 ou 3 variáveis independentes em dois níveis, para otimizar e construir modelos dentro de uma região

ótima; e validação das condições otimizadas pela construção de superfície de resposta (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978; RODRIGUES; IEMMA, 2014).

1.2.1 Planejamento Plackett-Burman (P-B)

Este planejamento é classificado como um delineamento fatorial fracionado saturado de dois níveis proposto em 1946 pelos estatísticos R.L. Plackett e J.P. Burman (PLACKETT; BURMAN, 2008). Este tipo de planejamento foi desenvolvido como um modelo econômico, devido ao reduzido número de experimentos, para a análise exploratória e seleção de variáveis. Além disso, tem se mostrado adequado para avaliação da robustez durante a etapa de validação de um método (FEDENIUK et al., 2015; HEYDEN; MASSART, 1996; KARAGEORGOU; SAMANIDOU, 2014).

Como regra, as matrizes devem ser construídas com k fatores, onde $k = (N - 1)$, sendo N o total de ensaios realizados. A primeira linha ou coluna da matriz possui um padrão de sinais estabelecido. Para $N = 12$, por exemplo, o padrão é segundo a função de Legendre:

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-

As linhas ou colunas subsequentes são formadas pelo deslocamento desse padrão de sinais, onde o último sinal se desloca para primeira linha/coluna, o sinal da primeira se desloca para segunda e assim por diante num movimento helicoidal (permutação para baixo).

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+

Uma última linha é adicionada contendo apenas sinais (-) para balancear o conjunto de níveis (MILLER; MILLER, 2010). Dessa forma, com 12 experimentos seria possível avaliar até 11 variáveis ao mesmo tempo. Entretanto, para a escolha de um delineamento P-B dois cuidados devem ser tomados para não comprometer as informações obtidas: o número total de ensaios deve ser, no mínimo, quatro a mais que o número de variáveis a serem estudadas, deixando alguns graus de liberdade para o cálculo do erro padrão e o ponto central deve ser realizado, no mínimo, em

triplicata (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001). Os fatores que restam são comumente denominados de “inertes” (*dummy factors*) e são considerados como auxiliares dos fatores reais.

O efeito de cada fator é calculado por

$$\text{Efeito}_i = \frac{\sum y_+}{6} - \frac{\sum y_-}{6} \quad \text{Eq. 1.1}$$

onde y_+ representa a resposta do sistema quando o fator em questão é mantido no seu maior nível e y_- a resposta do mesmo no seu nível baixo.

A simetria ortogonal do planejamento permite que o efeito de cada fator seja determinado de forma individual (efeitos principais). Como o planejamento P-B possui resolução III, produz efeitos principais que se confundem com os efeitos de interação entre dois fatores, sendo que estes últimos não podem ser determinados ((BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

Poucos trabalhos na literatura aplicaram o planejamento P-B para *screening* das variáveis empregadas no método QuEChERS, sendo a maioria deles voltados para análise de alimentos (LI et al., 2017; LIU et al., 2016; LUO et al., 2017; PETRARCA et al., 2014; YIN et al., 2014). Petrarca et al. (2014) identificaram a porcentagem de acetonitrila, volume de ácido acético e quantidade de MgSO_4 como os fatores mais significativos através do P-B para a recuperação de fumonisina B1 de arroz.

Já no trabalho de Zhou et al. (2018), o planejamento P-B indicou que as variáveis mais importantes na recuperação de micotoxinas e drogas veterinárias de amostras de leite e ovo foram as quantidades de PSA, NaCl, acetato de sódio e a porcentagem de ácido fórmico adicionada à ACN.

Apenas um trabalho propôs uma investigação preliminar do QuEChERS em matriz ambiental (solo) através do planejamento P-B (LI et al., 2014). Os autores avaliaram a influência de seis fatores (volume de água, quantidades de GCB, PSA e C18, porcentagem de ácido acético e tempo de extração) na extração por QuEChERS de um fungicida e seus metabólitos em solo. Os efeitos principais significativos para esse caso foram quantidade de PSA, volume de água e porcentagem de ácido acético.

Uma vez identificados os diversos fatores que influenciam no resultado analítico, são necessários outros tipos de planejamento para determinar a combinação de níveis do fator que proporcionará a resposta ideal.

1.2.2 Planejamento fatorial 2^k

Planejamento fatoriais de dois níveis, onde k é o número de fatores avaliados, são de extrema utilidade para investigar quais fatores tem influência sobre determinada resposta. São de simples execução, permitem que os fatores avaliados sejam qualitativos (tipo de solvente, de agitação, etc.) ou quantitativos (concentração do analito, pH, quantidade de sorvente, volume de solvente, etc.), e ainda, se necessário, podem ser ampliados para planejamentos mais sofisticados (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

Esse tipo de planejamento fatorial é considerado completo pois as variáveis são ensaiadas em todas as combinações possíveis. Por exemplo, se dois fatores são investigados para um determinado sistema, quatro experimentos abrangendo combinações entre os níveis mais baixos (-) e mais altos (+) dos fatores são executados. Como os fatores são alterados de forma conjunta, é possível inferir o efeito individual e a interação entre os fatores (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001; TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Os efeitos dos fatores avaliados são calculados de forma similar a Eq. 1.2, sendo:

$$\text{Efeito}_i = \bar{y}_+ - \bar{y}_- \quad \text{Eq. 1.2}$$

onde \bar{y}_+ representa a média das respostas obtidas no nível superior e \bar{y}_- a média das respostas no seu nível baixo (PEREIRA FILHO, 2015). No caso dos efeitos de interação, o valor de efeito é obtido pela combinação dos sinais de cada fator com a resposta obtida, a qual é aplicada na Eq. 1.2.

Um efeito, quer seja principal ou de interação, só é considerado significativo a partir da realização de duplicatas autênticas dos experimentos ou a partir da estimativa do desvio padrão de replicatas no ponto central (0). Para ambos os casos, o valor obtido é multiplicado pelo *t de Student* tabelado para determinado grau de liberdade e intervalo de confiança. Ainda, uma interpretação geométrica pode ser

atribuída aos efeitos calculados através da representação em um sistema cartesiano onde cada eixo corresponde a um fator (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001). Assim, para dois fatores, por exemplo, as respostas obtidas a partir do planejamento ocupam os vértices de um quadrado.

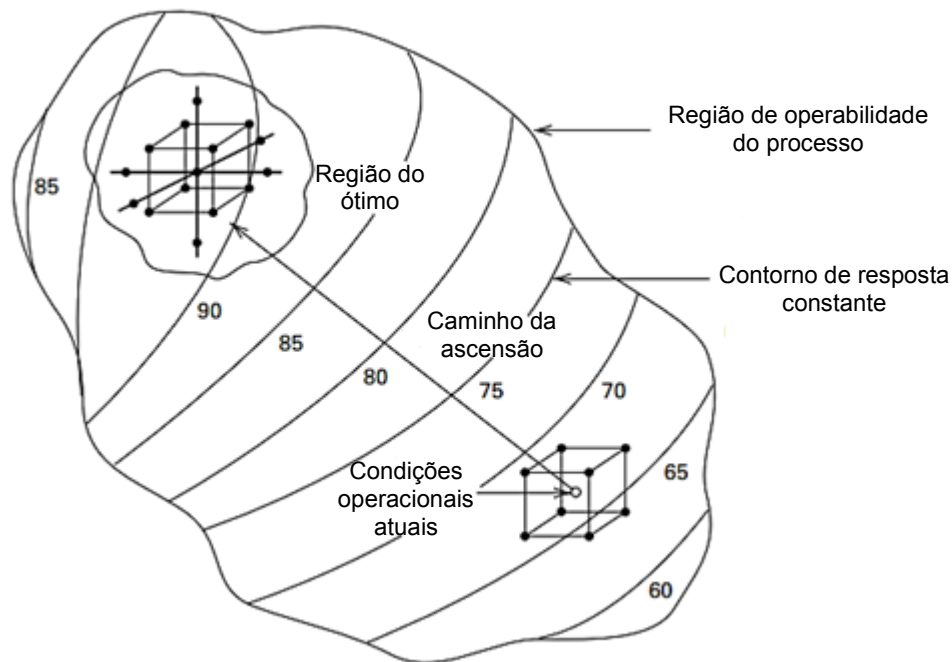
A principal vantagem dos planejamentos fatoriais completos é a completa varredura da região de estudo, pois utiliza todos os fatores e respectivos níveis, desde que haja um domínio prévio do sistema.

A utilização desse tipo de planejamento fatorial associado ao QuEChERS tem sido reportado com maior extensão, mas somente para matrizes alimentícias (FACCO et al., 2015; LORENZ et al., 2014; MATTAROZZI et al., 2016; VIERA et al., 2017). Lorenz et al. (2014) avaliaram inicialmente o processo de extração QuEChERS de agrotóxicos em frutas por meio de planejamentos 2^4 completo a fim de investigar as principais variáveis (quantidade de amostra e solvente, pH e temperatura), que influenciavam na recuperação dos analitos. Um planejamento 2^4 completo também foi empregado por Facco et al. (2015) para determinar as condições do QuEChERS mais favoráveis para extração de agrotóxicos de milho.

1.2.3 Metodologia de superfície de resposta e Planejamento Composto Central

A metodologia de superfície de resposta (RSM, do inglês, *response surface methodology*) é uma coleção de técnicas estatísticas e matemáticas úteis na modelagem e otimização de uma resposta, através de um procedimento sequencial, quando estas são influenciadas por múltiplos fatores (MONTGOMERY, 2012). Duas etapas distintas, modelagem e deslocamento, são repetidas até atingir uma região de resposta ótima (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001), através de caminho de máxima inclinação (Figura 1.3).

FIGURA 1.3 - PROCEDIMENTO SEQUÊNCIA APLICADO NA RSM



FONTE: Modificado de (MONTGOMERY, 2012).

Usualmente, a primeira etapa do RSM consiste em empregar um polinômio de ordem inferior para estabelecer uma correlação verdadeira entre a resposta de interesse e as variáveis independentes do sistema estudado. A partir dos planejamentos fatoriais completos com replicatas do ponto central é possível construir um modelo estatístico para descrever a resposta em termos de um modelo empírico linear:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + e \quad \text{Eq. 1.3}$$

onde x_1 e x_2 são as variáveis codificadas, os termos β são os parâmetros do modelo de regressão estimado através do método dos mínimos quadrados e e corresponde aos resíduos do modelo. β_0 é a média geral das respostas, enquanto que β_1 e β_2 são iguais as metades das estimativas dos efeitos correspondentes (MONTGOMERY, 2012; RODRIGUES; IEMMA, 2014).

A significância do modelo gerado é avaliada estatisticamente pela Análise de Variância (ANOVA). Além da regressão ser significativa e o modelo não apresentar falta de ajuste, o exame do comportamento dos resíduos é fundamental, pois deve ser compatível com o erro aleatório esperado para um determinado sistema. Idealmente, quando todas as previsões coincidem com as respostas experimentais observadas,

resíduos estão ausentes (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001). O modelo ajustado pode ser expresso através de uma superfície de resposta ou gráfico de contorno nos quais é possível visualizar a proximidade do ponto ótimo (MONTGOMERY, 2012).

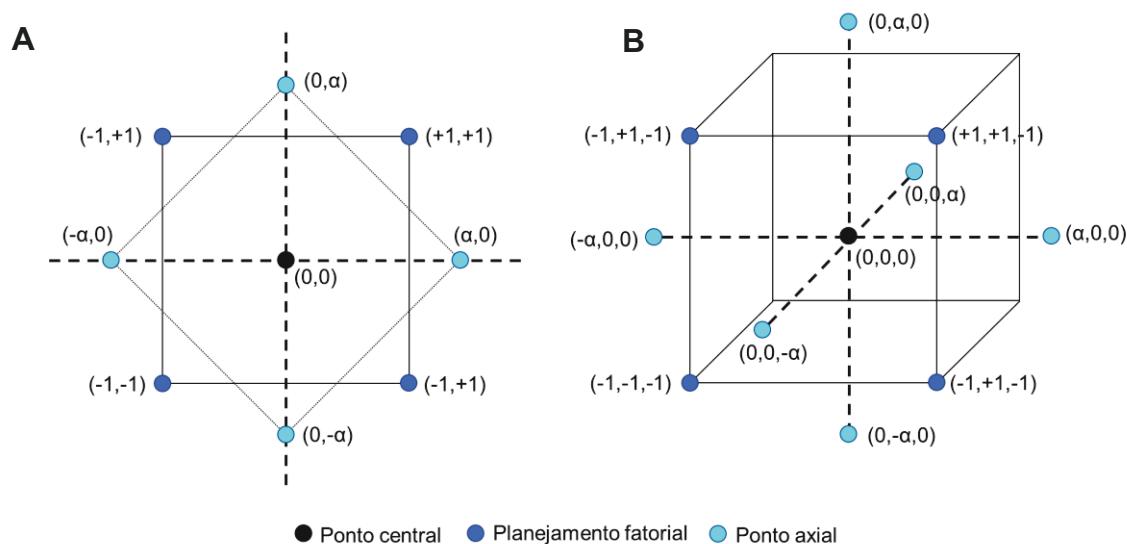
Uma vez encontrada a região mais próxima do ótimo ou, por outro lado, se as respostas não foram bem ajustadas para um modelo de primeira ordem, modelos mais elaborados, como os de segunda ordem, podem ser empregados (MONTGOMERY, 2012):

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{1,1} x_1^2 + \beta_{2,2} x_2^2 + \beta_{1,2} x_1 x_2 + e \quad \text{Eq. 1.4}$$

Nesse caso, além dos ensaios de um planejamento 2^k , ponto axiais são acrescentados, a fim de que se tenha pontos suficiente para estimar todos os parâmetros da equação.

O planejamento mais popular apropriado para o ajuste de segunda ordem é o Planejamento Composto Central (CCD, do inglês, *Central Composite Design*). Geralmente, os CCD consistem de três partes: a) um planejamento fatorial 2^k ; b) conjunto de experimentos no ponto central e c) experimentos nos níveis axiais (pontos situados nos eixos do sistema de coordenadas e possuem distância $\pm \alpha$ da origem – Figura 1.4A, onde $\alpha = \sqrt[4]{2^k}$) (TEÓFILO; FERREIRA, 2006). Para dois fatores, por exemplo, α equivale a $\sqrt{2}$. As repetições no ponto central têm por finalidade estimar o erro puro e estabilizar a variância da resposta prevista. O planejamento em estrela (Figura 1.4B) é um dos exemplos mais empregados de CCD, uma vez que permite a construção de uma superfície de resposta com um menor número de ensaios. Em um planejamento em estrela, um planejamento idêntico ao inicial é acrescentado, porém girando 45° em relação a orientação original (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

FIGURA 1.4 - REPRESENTAÇÃO DE UM PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL PARA A) 2 E B) 3 FATORES.



FONTE: Adaptado de (MONTGOMERY, 2012)

Uma das principais vantagens dos CCD é que eles podem ser construídos sequencialmente de acordo com a necessidade, já que é formado por três partes distintas. Um exemplo disso é que se um ajuste linear obtido através das respostas do planejamento fatorial for satisfatório, não há necessidade da execução dos pontos axiais.

Com o intuito de otimizar o método QuEChERS com um menor número de experimentos e possibilidade de construção da superfície de resposta, muitos autores tem utilizado o CCD (FACCO et al., 2015; KEMMERICH et al., 2015; LI et al., 2017, 2014; RIZZETTI et al., 2016; ZHOU et al., 2018). Entretanto, visto a potencialidade deste tipo de ferramenta, os dados dessa natureza ainda podem ser considerados escassos.

Os trabalhos listados utilizam o CCD para avaliar tanto as condições de extração quanto as de *clean-up*. Rizzetti et al. (2016) propuseram o uso de CCD para otimizar as condições do QuEChERS incluídas como relevantes a partir de uma otimização univariada preliminar (concentração de hidróxido de sódio e quantidades de C18, PSA e acetato de sódio). Como as amostras estudadas apresentavam caráter ácido (suco de laranja), a concentração de NaOH teve efeito significativo bem como os sorventes analisados, os quais apresentaram efeitos antagônicos no número de compostos recuperados na faixa adequada.

Kemmerich et al. (2015) investigaram várias fases sorventes na etapa de *clean-up* para extração de agrotóxicos de pimenta. Além de C18, PSA e carvão grafitizado, foram testadas fases comumente empregadas na extração em fase sólida como Oasis HLB® e Strata X®, cobrindo uma ampla faixa de polaridades, custo e características de adsorção. A maior influência observada na extração de 81 agrotóxicos estava relacionada à quantidade, independentemente do tipo de sorvente.

Alguns autores optaram pela investigação utilizando a metodologia de superfície de resposta, iniciando o estudo das variáveis empregando planejamento P-B e, posteriormente, otimizando as variáveis significativas empregando o CCD. Li et al (2014) otimizaram as condições previamente selecionadas (quantidade de PSA, volume de água e porcentagem de ácido acético) para extração de fungicidas e seus metabólitos de solo em um CCD 2³. O modelo quadrático construído foi significativo e sem falta de ajuste com 95% de confiança. O método otimizado quimiometricamente foi empregado com sucesso na determinação de fluxapiraxade em solo (24 µg kg⁻¹), bem acima do limite de quantificação de 0,5 µg kg⁻¹.

Tais relatos sugerem uma excelente abordagem para investigação das principais variáveis do método de extração QuEChERS com a utilização de técnicas quimiométricas de planejamento de experimentos.

1.3 PARÂMETROS DE MÉRITO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A performance de um método analítico deve ser avaliada de forma criteriosa a fim de garantir a qualidade e confiabilidade dos dados independente da metodologia de análise utilizada. A validação é “um estudo experimental e documentado cujo objetivo é demonstrar que o procedimento analítico avaliado é adequado à finalidade proposta, de forma a assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos” (MAPA, 2011). Como o resultado de uma análise está diretamente atrelada a uma tomada de decisão, a obtenção de dados analíticos não confiáveis pode trazer riscos difíceis de mensurar. O processo de validação é contínuo e exige do analista planejamento criterioso e estatisticamente consistente desde as etapas iniciais do desenvolvimento do método (MAPA, 2011; RIBANI et al., 2004).

Não existe uma convergência entre os documentos oficiais de normatização do processo de validação. No âmbito nacional, a ANVISA (Agência Nacional de

Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) fornecem os guias de validação RDC n° 166 de 2017 e DOQ-CGCRE-008 de 2010, respectivamente. As principais agências regulatórias também apresentam documentos quanto a validação de métodos analíticos (ANVISA, 2017; EC, 2002; ICH, 2005; INMETRO, 2010; MAGNUSSON; ÖRNEMARK, 2014; SANCO, 2010; SANTE/EU, 2015; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Dessa forma, os parâmetros de validação devem ser baseados na intenção do uso do método (RIBANI et al., 2004). As figuras de mérito mais abordadas são seletividade, linearidade, exatidão, precisão (repetitividade e precisão intermediária), limites de detecção e quantificação e robustez.

1.3.1 Seletividade

Um dos primeiros passos no processo de validação de um método é a verificação da extensão na qual um método analítico pode ser usado para determinar os analitos alvo em misturas ou matrizes sem interferências de outros componentes de comportamento semelhante (MAGNUSSON; ÖRNEMARK, 2014). Essa avaliação deve ser contínua ao longo do desenvolvimento do método. A capacidade do método de discriminar o analito de substâncias análogas como isômeros, metabólitos, produtos de degradação e demais constituintes da amostra (EC, 2002), é particularmente importante para análises de amostras ambientais. O termo seletividade é recomendado pela IUPAC; apesar disso, o termo especificidade também pode ser encontrado em diversos guias de validação (EC, 2002).

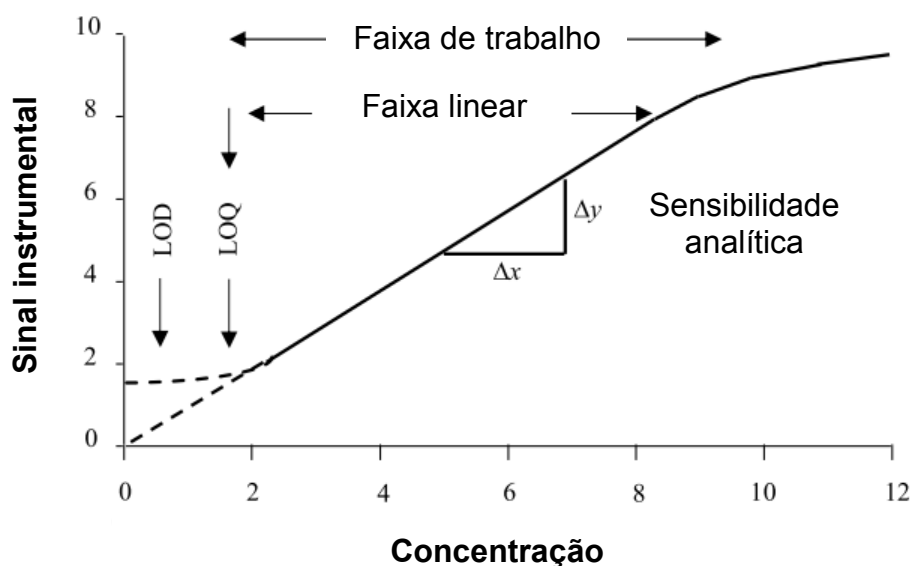
Existem diversas formas de avaliação da seletividade: a) análise da matriz isenta e fortificada com o analito; b) comparação entre a amostra processada fortificada e sinal do analito em solvente; c) através da confirmação pela resposta dos detectores por arranjo de diodos (pureza de pico) e espectrômetro de massas (massa e fragmentação), que fornecem comparação do espectro do pico obtido na separação com o de um padrão; e d) adição de possíveis interferentes na amostra (EC, 2002; ICH, 2005; MAGNUSSON; ÖRNEMARK, 2014).

No caso do método não ser seletivo a um determinado grupo de analitos em uma matriz, outros parâmetros importantes para um método analítico, como a linearidade, exatidão e precisão, estarão comprometidos (INMETRO, 2010).

1.3.2 Linearidade

Linearidade é a capacidade do método produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de uma faixa de concentração (faixa de trabalho). A faixa de trabalho (Figura 1.5) deve estar correlacionada com as concentrações esperadas durante a aplicação do método. Os limites inferiores e superiores da faixa de trabalho estão restritos pelo limite de quantificação (LOQ) e da resposta do equipamento, respectivamente (INMETRO, 2010). Os desvios da linearidade são comuns em concentrações elevadas devido a resposta não ideal de detectores ou a efeitos químicos (SKOOG et al., 2005).

FIGURA 1.5 - EXEMPLO TÍPICO DE CURVA ANALÍTICA OBTIDA EM DETERMINADA FAIXA DE CONCENTRAÇÃO.



FONTE: Adaptado de (MAGNUSSON; ÖRNEMARK, 2014)

A linearidade é geralmente determinada empiricamente por meio de um mínimo de cinco concentrações diferentes, distribuídas em intervalos regulares, em triplicata ($n=3$).

O ajuste linear para cada analito é calculado a partir do método de mínimos quadrados ordinários (MMQO), sendo a expressão resultante uma equação linear:

$$y = ax + b$$

Eq. 1.5

onde a e b são, respectivamente, os coeficientes angular e linear. Este último pode ainda ser chamado de intercepto (o valor de y quando x for zero). Uma vez que o coeficiente angular indica a inclinação da reta, pode-se estimar a sensibilidade do método para determinado analito e matriz através deste parâmetro.

A utilização do MMQO exige a adequação dos dados frente a alguns parâmetros do método. Para que a regressão linear seja válida, além da relação linear entre a concentração e a área de pico, refletida no coeficiente de determinação (R^2), os resíduos precisam ter distribuição aleatória, serem independentes entre si e homocedásticos (distribuição constante dos resíduos dentro da faixa de trabalho). A aleatoriedade pode ser avaliada visualmente pelo gráfico de distribuição dos resíduos (\hat{y} versus resíduos, onde \hat{y} se refere a resposta teórica obtida a partir da equação da reta). A homocedasticidade deve ser avaliada em termos de análise das variâncias das respostas instrumentais (teste F) entre os níveis de concentração avaliados. Quando o valor de F obtido entre dois níveis da curva analítica for inferior ao tabelado, consideram-se as respostas homocedásticas. A independência dos resíduos foi calculada pelo teste de Durbin-Watson:

$$d = \frac{\sum_{i=2}^N (e_i - e_{i-1})^2}{\sum_{i=1}^N e_i^2} \quad \text{Eq. 1.6}$$

onde e corresponde ao valor dos resíduos ($y_{\text{experimental}} - y_{\text{teórico}}$). Os resíduos são considerados independentes quando $d > d_u$ (d_u é tabelado e depende do tamanho do conjunto amostral) (MAPA, 2011).

Experimentalmente, as curvas analíticas podem ser construídas a partir de: a) padrões de calibração em solução ou solvente; b) matriz isenta dos analitos fortificada com os padrões e c) extrato da matriz isenta dos analitos fortificado com os padrões (MAPA, 2011).

Dentre os métodos de calibração mais empregados para a quantificação dos compostos estão a padronização externa e interna, superposição de matriz e adição de padrão. A mais comum e simples é a padronização externa e, assim é denominada, pois os padrões de calibração são preparados e analisados separados das amostras (CUADROS-RODRÍGUEZ et al., 2007). O sinal da amostra obtida é correlacionado com a curva analítica construída a partir das soluções-padrão por interpolação

(KOŚCIELNIAK; WIECZOREK, 2016). Este método é mais suscetível aos desvios gerados por componentes presentes na matriz da amostra.

A padronização interna consiste em adicionar quantidade conhecida e constante de um composto denominado padrão interno (PI) às soluções padrão na faixa de concentrações a ser investigada. Idealmente, um bom PI deve ser similar ao analito e possuir um tempo de retenção próximo ao ser quantificado, não fazer parte da amostra e nem reagir com componentes da amostra (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Após análise dessas soluções, a curva analítica é construída correlacionando a razão das áreas analito/PI com a concentração. As amostras são analisadas da mesma forma, com adição do PI. A padronização interna é uma forma de reduzir as influências no decorrer do método analito, pois o fator de resposta não se altera (RIMAYI et al., 2015). Por outro lado, o alto custo de aquisição de padrões internos, é uma das desvantagens do método.

O estabelecimento do método de superposição de matriz (*matrix-matched*) consiste na adição do padrão do analito em uma matriz livre da presença dos analitos, mas similar à da amostra. A construção da curva pode ser realizada tanto por padronização externa quanto interna. A principal vantagem desse método é a compensação do efeito matriz pela aproximação da correspondência com a composição da amostra (RIBANI et al., 2004). O efeito matriz tende a ser bastante variável e de difícil predição pois se refere a resposta de um ou mais componentes com distintas propriedades físicoquímicas (CUADROS-RODRÍGUEZ et al., 2007).

Em amostras nas quais pode ocorrer o efeito matriz e não se tem a matriz isenta dos analitos, o método de adição de padrão é mais indicado. O procedimento básico desse método consiste na adição de solução padrão de concentração crescente conhecida enquanto os demais componentes da amostra permanecem constantes. A curva analítica é construída em função da concentração adicionada de analito, enquanto que a concentração inicial da amostra é obtida a partir da extrapolação da curva ($y = 0$) (KOŚCIELNIAK; WIECZOREK, 2016).

1.3.4 Exatidão

A exatidão de um método expressa a proximidade do valor obtido de um valor referência. Dessa forma, ela é estudada em termos de veracidade e precisão. A veracidade, por sua vez, é o “grau de concordância entre a média de um número

infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência”. Como não é possível obter experimentalmente um número infinito de medidas, a veracidade é avaliada pelo desvio (*bias*), que recai na comparação da médias dos resultados experimentais com uma referência (MAGNUSSON; ÖRNEMARK, 2014; MAPA, 2011). Quanto menor essa diferença, mais exato é o método. Para calcular a veracidade em termos de *bias*, se faz necessário o uso de materiais de referência certificado (CRM) ou comparação de métodos. Os CRM são padrões internacionais com uma incerteza conhecida e, portanto, podem ser usados para abordar todos os aspectos do *bias* (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). A resposta das amostras padrão obtidas pelo método testado são comparadas com o valor referência certificado. Nesse caso, como é necessária a aquisição do CRM, o preço das análises se eleva. A comparação de métodos consiste em assumir que o valor de referência é obtido através de um método referência estabelecido com incerteza conhecida (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). O *bias* é calculado com base em avaliações estatísticas, como o teste t de comparação de médias, por exemplo.

Na ausência de CRM, outros dois modos são empregados para investigar a veracidade: ensaios de recuperação e adição de padrão.

Sem dúvida, a recuperação (R) é o método mais empregado para avaliar a exatidão no desenvolvimento de métodos analíticos. As amostras são fortificadas com concentrações conhecidas do analito e submetidas a análise. A diferença entre os dois resultados, concentração obtida e fortificada, é chamada de recuperação:

$$Exatidão \% = \frac{\text{Concentração média medida} \times 100}{\text{concentração de fortificação}} \quad \text{Eq. 1.7}$$

Não existe convergência quanto a faixa de concentração em que a recuperação deve ser investigada. O ICH, INMETRO e ANVISA, por exemplo, estabelecem que três níveis de concentração distribuídos dentro da faixa linear devem ser analisados em triplicata. A SANCO/825/00, por sua vez, requer quintuplicata em dois níveis de concentrações (próximas ao LOQ e outra superior). A Diretiva 657 da Comunidade Europeia, preconiza que, quando não é possível a comparação com um padrão de referência, fortificam-se brancos da matriz, nas concentrações de 1, 1,5 e 2 vezes a concentração mínima requerida para uma boa performance do método em sextuplicata.

Nos métodos de adição de padrão, para os quais não é possível obter uma amostra isenta dos analitos, a recuperação é calculada como:

$$R \% = \frac{(\text{Concentração média medida} - \text{concentração do branco}) \times 100}{\text{concentração de fortificação}} \quad \text{Eq. 1.8}$$

Os níveis aceitos para os valores de recuperação variam diretamente com a faixa de concentração investigada. González, Herrador e Asuero (2010), baseados em levantamentos estatísticos, propuseram diversas porcentagens de recuperação com base no nível de concentração do analito. Para analitos presentes na amostra em concentrações de até uma parte por bilhão são admitidas recuperações entre 40 e 120% (GONZÁLEZ; HERRADOR; ASUERO, 2010). Os critérios de aceitação admitidos pela Diretiva 657 da Comunidade Europeia para o estudo de recuperação dos analitos são bastante rígidos, sendo considerados adequados quando os valores estão dentro de $\pm 10 \%$ do valor alvo (concentração de fortificação). A SANCO/825/00 admite valores de recuperação de 70 a 120%, mas aceita valores fora dessa faixa desde que justificáveis.

1.3.3 Precisão

Do ponto de vista estatístico, a precisão mede a dispersão dos dados em determinadas condições de análise. A precisão é dependente da concentração do analito e então deve ser determinadas ao longo da faixa de concentração de interesse (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). É comumente expressa por meio da repetitividade, precisão intermediária e da reprodutibilidade. Nas condições usualmente empregadas nos laboratórios de pesquisa, a validação da precisão em termos das duas primeiras é aceita.

A repetibilidade expressa a precisão avaliada sob as mesmas condições experimentais (mesmo operador, equipamento, local, solução padrão, etc) em um curto período de tempo. A repetibilidade também é conhecida por precisão intradia ou intraensaio.

A precisão intermediária (interensaio ou reprodutibilidade intralaboratorial), está relacionada a precisão avaliada empregando condições similares a da repetitividade quanto a amostra, método e laboratório, mas diferindo em uma ou mais

condições (diferentes analistas, equipamentos, dias, entre outros). Os experimentos realizado para precisão intermediária devem refletir as condições dentro do laboratório em um futuro ensaio (GONZÁLEZ; HERRADOR; ASUERO, 2010).

Em ambos os casos, a precisão pode ser expressa pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV), segundo a Equação 1.9:

$$\text{RSD}\% = \frac{s}{\bar{c}} \times 100 \quad \text{Eq. 1.9}$$

onde s é a estimativa do desvio padrão e \bar{c} é a concentração média das replicatas ensaiadas.

Em geral, os experimentos para determinação da precisão acompanham os ensaios realizados para a recuperação (EC, 2002; INMETRO, 2010; SANCO, 2010; TECHNICAL; USE, 1996). Assim como para recuperação, o critério de aceitação para valores de precisão também é dependente da faixa de concentração estudada. A Diretiva 657 da Comunidade Europeia e o guia da SANCO/825/00 aceitam valores de precisão de até 20% para frações mássicas dos analitos na faixa de 10 a 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Além disso, é esperado que menores dispersões nos resultados sejam observadas para ensaios de repetibilidade (MAGNUSSON; ÖRNEMARK, 2014).

1.3.5 Limites de detecção e quantificação

A determinação dos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) tem grande importância para métodos cujo o objetivo é determinar baixos níveis de concentração (INMETRO, 2010). Dessa forma, esses parâmetros são cruciais para estabelecer um limite estatisticamente seguro para a quantificação de analitos próximo a esses níveis.

O LOD pode ser definido como a menor concentração detectável da substância em análise, mas sem garantia de precisão e exatidão. O LOQ por sua vez, é a menor concentração do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Apesar disso, esses termos são ainda hoje bastante controversos, principalmente devido a divergência na terminologia aplicável. Por exemplo, o LOD não é aceito por todas as guias de validação (INMETRO, 2010). A SANCO/825/00 é um desses casos e apenas admite o LOQ como sendo o menor nível validado com relação a precisão e recuperação.

Isso reflete nas diferentes possibilidades de como esses parâmetros podem ser determinados: método visual, com base nos parâmetros da curva analítica, com base na relação sinal/ruído. Shrivastava et al. (2011) fizeram um levantamento e discussão de todas as propostas apresentadas em documentos de validação internacional para o LOD e LOQ (SHRIVASTAVA; GUPTA, 2011).

É necessário então, que a melhor forma de determinação dos LOD e LOQ seja estudada para cada caso, desde que fundamentada em critérios analíticos.

1.3.6 Robustez

O conhecimento sobre a robustez de um método é fundamental para garantir a validade analítica do mesmo. Ela pode ser definida como a “susceptibilidade de um método analítico frente a pequenas mudanças nas condições experimentais” (KARAGEORGOU; SAMANIDOU, 2014). Tais alterações compreendem mudança de reagente, condições de estocagem, condições do preparo de amostra e do método de análise, pH e temperatura. O teste de robustez indica o quão preciso deve ser o controle das variáveis que influenciam o sistema, levando a uma maior reprodutibilidade do método (HEYDEN; MASSART, 1996).

A validação da robustez pode ser feita por pequenas alterações nos fatores que influenciam o método de forma univariada ou empregando planejamentos fatoriais, como por exemplo, o planejamento fracionário Plackett-Burman (FEDENIUK et al., 2015). O planejamento mais conhecido aplicado a robustez é o teste de Youden, que além de avaliar a robustez do método, também ordena a influência de cada fator no resultado final. Esta abordagem é recomendada pelo INMETRO e pela Diretiva 657. No teste de Youden, sete fatores são investigados em oito ensaios, realizados em duplicata para o cálculo do efeito. Como se trata de um planejamento fatorial fracionário, para investigar menos fatores, não basta excluir as linhas da matriz de planejamento, mas sim se deve selecionar um planejamento mais indicado.

Segundo o MAPA (2011) não existe atribuição de um valor numérico para a robustez por não se tratar de uma grandeza física ou química. A avaliação se dá em relação a significância de um efeito sobre a resposta esperada. Quando não há efeito significativo, o método analítico é considerado robusto.

CAPÍTULO 2 : ANÁLISE MULTICLASSE DE CONTAMINANTES DE PREOCUPAÇÃO EMERGENTE EM ÁGUAS SUPERFICIAIS USANDO QUECHERS-LC-DAD

2.1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, as inúmeras atividades antrópicas contribuíram com a contaminação de praticamente todos os compartimentos ambientais, levando a um problema mundial no que se refere à ocorrência de poluentes no ambiente (GAVRILESCU et al., 2015; GHISELLI; JARDIM, 2007; GRAZIELI; COLLINS, 2011; TIJANI; FATOBA; PETRIK, 2013).

CEC ou Contaminantes Emergentes (CE) são termos que definem, de forma ampla, “qualquer produto químico sintético ou de ocorrência natural, ou ainda qualquer micro-organismo que não é comumente monitorado, mas tem potencial para entrar no ambiente com efeitos adversos conhecidos ou suspeitos à ecologia e/ou à saúde humana” (UNESCO, 2017). Tais compostos não haviam sido detectados anteriormente ou foram detectados em concentrações significativamente diferentes das reais devido a limitações instrumentais no âmbito da detecção. Além disso, todos os dias são lançados uma infinidade de compostos que podem se tornar novas fontes de contaminantes emergentes, tornando crescente a lista de candidatos (DA SILVA et al., 2013; LI, 2014; MURRAY; THOMAS; BODOUR, 2010; SAUVÉ; DESROSIERS, 2014).

Em geral, os CEC são encontrados em concentrações traço (na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1}), o que representa concentrações inferiores aos valores máximos permitidos pelas principais agências reguladoras, além de muitos deles serem ainda hoje negligenciados pelas legislações (COMERTON; ANDREWS; BAGLEY, 2009; MURRAY; THOMAS; BODOUR, 2010; STUART et al., 2012).

A lista de compostos xenobióticos inclui, por exemplo, as seguintes famílias de compostos químicos: compostos desreguladores endócrino (EDC, do inglês, *endocrine disrupting compounds*) como estrogênios naturais e sintéticos, alquilfenóis e ftalatos, fármacos e plastificantes (MOMPELAT; LE BOT; THOMAS, 2009; PATROLECCO et al., 2013; VALLS-CANTENYS et al., 2016; ZIYLAN; INCE, 2011). Todos os grupos listados apresentam risco aos ecossistemas nos quais são inseridos,

ainda que suas reais implicações não sejam bem conhecidas, pois dependem do comportamento, distribuição e interação entre as substâncias (GRAZIELI; COLLINS, 2011; LAPWORTH et al., 2012; RODIL et al., 2012; STUART et al., 2012).

2.1.1 Fármacos

A presença de fármacos no meio ambiente se deve basicamente às excreções metabólicas de pessoas e animais em tratamento médico, além do descarte incorreto em pias e vasos sanitários (BOTITSI; FROSYNI; TSIPI, 2007). Os principais problemas ambientais associados à presença de fármacos se relacionam com a sua bioacumulação e, no caso dos antibióticos, com o aumento da resistência microbiana (BOSCHER et al., 2010; FENT; WESTON; CAMINADA, 2006).

A Organização Mundial da Saúde (WHO, 2015) relatou que o mercado farmacêutico global está faturando 300 bilhões de dólares por ano, sendo grande parte investida na comercialização dos produtos. Esse panorama é de extrema preocupação já que o uso rotineiro de inúmeros produtos farmacêuticos levou, nos últimos anos, a um aumento na ocorrência destes compostos em diversas matrizes como água superficial (ARCHANA; DHODAPKAR; KUMAR, 2016; MONTAGNER; JARDIM, 2011), água subterrânea (PAÍGA; DELERUE-MATOS, 2016), afluentes e efluentes de estação de tratamento de esgoto (VALLS-CANTENYS et al., 2016). Mompelat et al. (2009) relataram a ocorrência de produtos farmacêuticos em águas superficiais, bem como, suas concentrações máximas. O antibiótico sulfametoxazol foi detectado nos EUA e França nas concentrações de 1900 e 540 ng L⁻¹, respectivamente. O anticonvulsivante carbamazepina foi encontrado em concentrações que variaram de 43 a 258 ng L⁻¹ em países como Alemanha, França e EUA.

Em estudos similares, o estimulante cafeína foi encontrado em países como EUA e França em concentrações de até 119 ng L⁻¹ (GAFFNEY et al., 2014; MOMPELAT; LE BOT; THOMAS, 2009). Quantidades extremamente elevadas de fármacos foram quantificadas por HPLC-MS/MS em afluentes (19850 ng L⁻¹ de acetaminofeno e 4215 ng L⁻¹ de ibuprofeno) e efluentes (1032 ng L⁻¹ de diclofenaco) de duas estações de tratamento de esgoto da cidade de Catalunha (PEDROUZO et al., 2011). Em Luxemburgo, Pailler et al. (2009) encontraram níveis elevados de ibuprofeno (10 – 4000 ng L⁻¹) em águas superficiais e residuárias principalmente

durante períodos chuvosos. Liu et al. (2009) compilaram dados de alguns desreguladores endócrinos como hormônios e nonilfenol encontrados em águas superficial, subterrânea e para consumo humano em vários países. Nos EUA em 2004, por exemplo, a presença de β -estradiol na concentração de 13 a 80 ng L⁻¹ nas águas subterrâneas foi relatada na região entre os estados de Missouri e Arkansas (LIU; KANJO; MIZUTANI, 2009).

No Brasil, os primeiros estudos orientados a avaliar a presença deste tipo de contaminação iniciaram na década de 90, quando Stumpf et al. reportaram em 1999 pela primeira vez a presença de compostos farmacologicamente ativos (PhAC, do inglês *pharmaceutically active compounds*) em esgotos, efluentes e águas naturais, no estado do Rio de Janeiro (STUMPF et al., 1999). Mais recentemente, Maldaner e Jardim (2012) avaliaram diversos poluentes orgânicos emergentes em água para consumo humano fornecidas por diferentes estações de tratamento de água da cidade de Campinas (MALDANER; JARDIM, 2012). Após o desenvolvimento do método, a análise de amostras reais comprovou a presença de alguns compostos como diazepam, ibuprofeno e paracetamol abaixo do limite de quantificação da técnica estabelecida. Tais trabalhos destacam a presença onipresente destes poluentes em compartimentos ambientais e uma preocupação constante com as águas disponibilizadas para consumo humano, enfatizando a necessidade do desenvolvimento e aprimoramento de técnicas analíticas para a detecção dos mesmos.

2.1.2 Hormônios e Bisfenol A

Estrogênios naturais – estrona (E1), 17 β -estradiol (E2), estriol (E3) – são hormônios esteroidais produzidos a partir do colesterol, com a função de estimular o desenvolvimento de estruturas reprodutivas femininas e características sexuais secundárias (AUFARTOVÁ et al, 2011). Hormônios sintéticos como o 17 α -etinilestradiol (EE2), são utilizados em terapias de reposição e métodos contraceptivos (BILA; DEZOTTI, 2007; REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA, 2006).

Similarmente aos fármacos, a principal via de contaminação ambiental por estrogênios é representada pela excreção de hormônios naturais, principalmente de mulheres em idade fértil (LINTELMANN et al., 2003; REIS FILHO; ARAÚJO; VIEIRA,

2006), e sintéticos, principalmente utilizados como contraceptivos (AUFARTOVÁ et al., 2011; BILA; DEZOTTI, 2007).

O bisfenol A (BFA) é um conhecido plastificante empregado em larga escala na produção de plástico policarbonato, resinas epóxi, poliésteres e retardantes de chama (SALGUEIRO-GONZÁLEZ et al., 2017). Muitos dos produtos usados diariamente, como por exemplo, componentes eletrônicos, garrafas plásticas, recipientes para comida e até mesmo resinas dentárias e dispositivos médicos, apresentam BFA em sua constituição.

Em geral, estima-se que a alteração provocada por estas espécies poluentes no sistema endócrino pode envolver mecanismos antagonistas ou de mimetização na ação dos hormônios, desregulação da biossíntese ou do metabolismo dos esteróides e ainda, alteração do número de receptores hormonais (COMERTON; ANDREWS; BAGLEY, 2009; LINTELMANN et al., 2003; PACÁKOVÁ et al., 2009). Os efeitos relatados na literatura convergem para o aparecimento de anormalidades no sistema reprodutivo, destacando a interferência na síntese de receptores estrogênicos, infertilidade, aumento da incidência de câncer e feminização de espécies (SHI et al., 2017; SOLOMON; SCHETTLER, 2000; WARING; HARRIS, 2005).

Apesar de serem considerados ainda como contaminantes não-regulados em termos de concentração máxima permitida em águas de diversas origens, os hormônios E2 e EE2 foram recentemente incluídos na lista de substâncias prioritárias da Diretiva da Comunidade Europeia e na lista de candidatos a novos contaminantes da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 2009). Por outro lado, o BFA ainda não foi incluído como substância prioritária, mesmo havendo evidências dos seus diferentes efeitos sobre os organismos (PERKINS et al., 2017; SHI et al., 2017).

A detecção desses compostos já foi realizada em amostras coletadas em estações de tratamento de esgoto (CORRALES et al., 2015; DIAS et al., 2015; KUSTER et al., 2008; PEDROUZO et al., 2011; VYMAZAL; BŘEZINOVÁ; KOŽELUH, 2015), em águas superficiais (MACHADO et al., 2016; MARTINOVIC-WEIGELT et al., 2013; PRIETO; SCHRADER; MOEDER, 2010) e até mesmo em águas de abastecimento (NIE et al., 2014). No Brasil, o monitoramento de hormônios também foi iniciado por Stumpf et al. (1999) e segue até os dias atuais: Sodré et al. (SODRÉ et al., 2007) detectaram E1, E2, E3 e EE2 entre LOQ e 39 ng L⁻¹ em amostras de água de rio da região de São Paulo. Ainda, os autores encontraram BFA em todas as

amostras coletadas em concentrações de até 84 ng L⁻¹ (SODRÉ et al., 2010). Torres et al. (2015) monitoraram os mesmos hormônios do trabalho anterior em águas destinadas ao consumo humano tendo sido encontradas concentrações entre 28 e 194 ng L⁻¹. Machado et al. (2016) detectaram BFA em águas de reservatório na cidade de São Paulo em concentrações de 11 a 19 ng L⁻¹.

Neste contexto, o monitoramento de poluentes de preocupação emergente é um dos principais desafios do último século. Matrizes aquáticas são consideradas complexas, pois apresentam grande variedade de compostos interferentes, matéria orgânica e minerais. Em função das dificuldades que este tipo de análise implica, o desenvolvimento de métodos analíticos deve permitir a detecção destes compostos em concentrações traço e em matrizes de elevada complexidade, como alimentos, solo, águas naturais e efluentes. Além do emprego de técnicas cromatográficas acopladas à detecção por espectrometria de massas, o monitoramento de múltiplas classes de poluentes orgânicos também pode ser realizado empregando detectores por arranjo de diodos desde que o preparo de amostra seja adequadamente executado e que os compostos de interesse absorvam na região do UV-Vis. O método QuEChERS é uma abordagem de maior simplicidade analítica para extração e *clean-up* de amostras que vem sendo atualmente empregado na análise de alimentos.

Como o método QuEChERS é pouco explorado para matrizes ambientais, para garantir níveis adequados de recuperação, é relevante a utilização de ferramentas quimiométricas como planejamentos fatoriais na etapa de otimização. As principais vantagens da otimização multivariada de um método é a redução do número de experimentos, economia de reagentes e, principalmente, a possibilidade de avaliar possíveis efeitos de interação entre as variáveis.

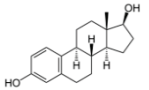
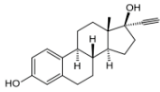
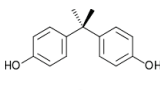


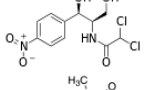

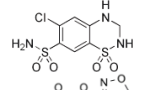
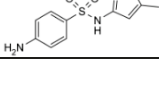
Dentro deste contexto, o presente trabalho propõe a otimização do método QuEChERS como técnica para extração de nove analitos (fármacos, hormônios e bisfenol A) de água superficial. Um planejamento fatorial fracionário foi empregado para identificar os principais fatores que influenciavam o método, sendo, posteriormente, otimizados em um planejamento composto central. O método desenvolvido foi validado e aplicado em amostras de água coletadas no rio Belém (Curitiba-PR) em diferentes estações do ano.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Reagentes e materiais

Representantes de diversas classes foram selecionados: antibióticos (sulfametoxazol, cloranfenicol), hormônios naturais e sintéticos (β -estradiol e 17α -etinilestradiol), psicotrópicos (carbamazepina, diazepam), estimulante e/ou traçador de lançamento de esgoto doméstico em águas naturais (cafeína), além do plastificante bisfenol A de atividade reconhecida no sistema endócrino. Os padrões (Tabela 2.1) dos fármacos, estrogênios e bisfenol A foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St Louis, MO, EUA). Para a cafeína e hidroclorotiazida, padrões farmacêuticos foram empregados (Farmanguinhos Fio Cruz). Os padrões dos psicofármacos, diazepam e carbamazepina, foram adquiridos da USP® (Rockville, MD, EUA).

TABELA 2.1 - ESTRUTURA MOLECULAR E PROPRIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DOS COMPOSTOS SELECIONADOS

Analito / Classe	Estrutura Molecular	Massa Molar / g mol ⁻¹	Solubilidade a 25 °C / mg L ⁻¹	pK _a	log K _{ow}
β -Estradiol (E2) Estrogênio natural		272,39	3,6*	10,33	4,01
17α -Etinilestradiol (EE2) Estrogênio sintético		296,41	11,3*	10,33	3,67
Bisfenol A (BFA) Plastificante		228,29	120	9,6	3,32
Cafeína (CAF) Estimulante/ traçador de lançamento de esgoto		194,19	21600	14	-
Carbamazepina (CBZ) Antiepilético		236,27	17,7	15,9	2,45
Cloranfenicol (CRF) Antibiótico		323,13	2500	7,49	1,14
Diazepam (DZP) Anxiolítico		284,74	50	3,4	2,82
Hidroclorotiazida (HCT) Diurético		297,73	722	7,9	-
Sulfametoxazol (SMX) Antibiótico		253,28	610**	6,16	0,89

* solubilidade à 27 °C

** solubilidade à 37 °C

Fonte: (DRUGBANK, 2018; KIM et al., 2016)

A acetonitrila e o metanol grau HPLC foram adquiridos da J.T. Baker® (Philipsburg, NJ, EUA). A água de osmose foi adquirida através de um sistema de osmose reversa Quimis® Q842 (Diadema, SP). A água deionizada foi obtida com um sistema Milli-Q® equipado com uma lâmpada UV (18,2 MΩ cm, Bedford, MA, EUA), alimentado com a água de osmose. Sulfato de magnésio anidro (MgSO₄), cloreto de sódio (NaCl), sorventes para o *clean-up*, etilenodiamino-N-propilsilano (PSA, 50 µm) e octadecilsilano (C18, 40 - 63 µm) foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St Louis, MO, EUA) e Agilent® (Santa Clara, EUA), respectivamente. Os extratos de acetonitrila foram secos sob fluxo de nitrogênio (90% de pureza) fornecidos pela Air Liquide.

O pH das soluções foi medido com um medidor de pH OHAUS Starter 2100. Foram utilizados tubos de polipropileno (15 mL) com tampas rosqueáveis (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil) para as extrações do procedimento QuEChERS.

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se vidraria analítica previamente calibrada. As vidrarias utilizadas para análise por LC foram lavadas com álcool etílico comercial, água da torneira e deixadas em banho de ácido nítrico 10% por um período mínimo de 24 horas. Em seguida, foram abundantemente enxaguadas com água de osmose reversa, água deionizada e secas ao ar ou em estufa.

2.2.2 Preparo das soluções

Soluções estoque de cada um dos analitos foram preparadas na concentração de 100 mg L⁻¹ dissolvendo-se 1,00 mg dos padrões em 10,0 mL de metanol. Estes padrões foram mantidos ao abrigo da luz e sob refrigeração (-20,0 °C). A partir destas soluções estoque, foram preparadas diariamente soluções trabalho por diluição em água deionizada ou solvente apropriado. Para amostras da curva analítica, foram preparadas soluções na fase móvel composta por 15% de acetonitrila e 85% de água deionizada. O tampão fosfato utilizado para os testes de fase móvel foi preparado pesando-se 1,3609 g de fosfato de potássio monobásico e dissolvido em um litro de água ultrapura. O pH da solução (3,5) foi então ajustado com ácido fosfórico concentrado.

2.2.3 Condições cromatográficas

As determinações foram realizadas em um equipamento de LC Agilent 1260 Infinity (Santa Clara, EUA) com um injetor automático G1329B 1260ALS, bomba quaternária G1311C 1260 VL e um detector por arranjo de diodos G1315C 1260DAD VL+ (volume de fluxo de células de 18 μL). Os cromatogramas foram adquiridos e processados usando o software OpenLab EZChrom Elite. A separação dos analitos foi realizada em uma coluna C18 Microsorb 250 \times 4,6 mm (tamanho de partícula de 5 μm) com coluna de guarda de mesma fase estacionária (12,5 \times 4,6 mm, 5 μm). As fases móveis foram previamente filtradas em membrana de PTFE 0,45 μm (Macherey Nagel) e desgaseificadas em um Ultrassom Ultracleaner 1400 (Unique, Indaiatuba, SP, Brasil).

O estabelecimento de uma rotina cromatográfica para fármacos de múltiplas classes teve como base algumas informações descritas na literatura para antibióticos: (ALGHAMDI, 2015; HOANG et al., 2015; MADUREIRA et al., 2010; SVERSUT et al., 2014); hormônios (VERBINNEN; NUNES; VIEIRA, 2010; ZHU et al., 2014); plastificantes (NENG; NOGUEIRA, 2014) e cafeína (BARANOWSKA; JOANNA, 2015). Como a literatura em geral não converge para um único método cromatográfico, alguns métodos foram propostos e testados empregando como fases móveis combinações entre acetonitrila, metanol, água e tampão fosfato 0,01 mol L⁻¹ pH 3,50.

Os nove analitos foram separados empregando vazão constante de 0,6 mL min⁻¹, em modo gradiente onde as fases móveis empregadas foram acetonitrila (fase A) e água ultrapura (fase B). A composição inicial de 15% A (85% B) foi aumentada linearmente até 85% A (15% B) em 32 minutos, passando a 100% A em 3 minutos, a qual foi mantida por 2 minutos. A seguir, a condição inicial foi alcançada e mantida por 3 minutos. O tempo total de corrida foi 45 minutos, com 50 μL de volume de injeção de amostra. A temperatura da coluna foi mantida em 30°C. A detecção foi realizada nos comprimentos de onda 254 nm (DZP), 270 nm (HCT e SMX) e 280 nm (CAF, CRF, CBZ, BFA, E2 e EE2). Curvas analíticas foram construídas em solvente na faixa de 2 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ e utilizadas para a estimar a concentração dos analitos durante a etapa de otimização.

Os fatores mais significativos obtidos através do planejamento P-B foram utilizados em um novo planejamento a fim de otimizar a extração. Para tanto um planejamento composto central (CCD) 2^3 com quintuplicata do ponto central foi desenvolvido com os fatores: quantidade de MgSO_4 , NaCl e PSA (Tabela 2.4). Os demais fatores foram mantidos conforme indicado pelo planejamento anterior (pH natural aproximadamente 7,0, tempo de extração 1 min, quantidade de C18 e MgSO_4 *clean-up* em 50 mg e 100 mg, respectivamente).

TABELA 2.4 - FATORES, NÍVEIS E MATRIZ DO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL 2^3 COM QUINTUPLICATA DO PONTO CENTRAL (VOLUME DA AMOSTRA: 5,0 mL)

Fator	Nível				
	$-\alpha^*$	-1	0	1	$+\alpha$
(X ₁) MgSO_4 / g	0,83	1	1,25	1,5	1,67
(X ₂) NaCl / g	0,66	1	1,5	2	2,34
(X ₃) PSA / mg	16,4	30	50	70	83,6
Ensaio	X ₁ / g	X ₂ / g	X ₃ / mg		
1	-1	-1	-1		
2	1	-1	-1		
3	-1	1	-1		
4	1	1	-1		
5	-1	-1	1		
6	1	-1	1		
7	-1	1	1		
8	1	1	1		
9	-1,68	0	0		
10	1,68	0	0		
11	0	-1,68	0		
12	0	1,68	0		
13	0	0	-1,68		
14	0	0	1,68		
15-19	0	0	0		

Após o cálculo dos efeitos, a Análise de Variância (ANOVA) com 95% de confiança foi realizada para examinar a significância dos efeitos obtidos e quando possível, a construção de superfícies de resposta foi realizada no Statistica 7.0 (Statsoft, USA).

Após determinar as melhores condições de extração via CCD, investigou-se a possibilidade do método QuEChERS apresentar um fator de concentração pela variação dos volumes de acetonitrila na etapa de extração e do volume de reconstituição com fase móvel. Foram avaliados a redução do volume de acetonitrila de 5,0 mL para 3,0 mL e 2,5 mL. Para os volumes de reconstituição, foram estudados

100, 250, 500 μL e 1,0 mL (este último utilizado anteriormente à etapa de sua otimização). Os resultados foram avaliados em termos de recuperação dos analitos e os desvios padrão relativos obtidos em cada caso.

2.2.5 Validação do método QuEChERS-LC-DAD

O método foi validado segundo critérios especificados pela Diretiva da Comissão Europeia 2002/657/EC (EC, 2002). Os parâmetros avaliados foram seletividade, faixa linear, precisão, exatidão e robustez.

A seletividade foi conduzida por comparação dos tempos de retenção dos analitos (t_R) e dos espectros dos analitos em solvente e na matriz aquosa. Um teste F entre a variância da solução padrão em dois níveis de concentração (20 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) foi comparada com a variância dessas mesmas concentrações nas amostras.

A linearidade foi estudada na faixa entre 1,0 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($n=3$) utilizando o método de superposição de matriz (*matrix-matched*). No caso de analitos que já estavam presentes na amostra coletada para construção das curvas (CAF e E2), as áreas obtidas a partir da fortificação foram subtraídas da média dos brancos. Este procedimento foi adotado diante da grande variação da concentração desses analitos nas diferentes coletas, inclusive estando ausente em algumas amostras. O método de adição de padrão foi utilizado para confirmar a concentração de cafeína nas amostras. As curvas analíticas foram construídas com pelo menos cinco níveis de concentrações. O ajuste linear para cada analito foi expresso pela equação da reta e coeficiente de determinação (R^2), calculados a partir do método de mínimos quadrados ordinários (MMQO), e análise dos resíduos quanto a aleatoriedade, homocedasticidade e independência.

A exatidão foi avaliada pela recuperação relativa (Eq. 1.7) de amostras fortificadas em 1, 1,5 e 2 vezes o valor de concentração mínima requerido para cada analito (20, 30 e 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a maioria dos analitos, exceto para SMX para a qual os níveis foram mantidos em 30, 40 e 60 $\mu\text{g L}^{-1}$).

A precisão do método foi estudada através da repetibilidade e precisão intralaboratorial (precisão intermediária, expressas pelo RSD calculado de acordo com a Eq. 1.9) nos mesmos níveis de concentrações dos ensaios de recuperação. No caso da precisão intermediária foram realizados ensaios em coletas diferentes (coleta de novembro e janeiro).

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) são considerados parâmetros de detectabilidade de um método. O LOD foi estimado usando os parâmetros da curva analítica de acordo com a Eq. 2.1:

$$LOD = 3,3 \times \frac{s}{S} \quad \text{Eq. 2.1}$$

onde s é a estimativa do desvio do coeficiente linear obtido para as três curvas analíticas independentes e S , o coeficiente angular (*slope*) da curva analítica média. O LOQ foi avaliado pelo método visual como sendo a menor concentração possível de detectar com exatidão e precisão ($RSD \leq 20\%$).

Para avaliar a estabilidade dos analitos em solução padrão, 32 amostras branco foram fortificados com $50 \mu\text{g L}^{-1}$. Duas amostras foram analisadas imediatamente após preparo e as demais amostras foram estocadas a -20°C , a 4°C , a temperatura ambiente na presença e ausência de luz (frasco âmbar) e analisadas após 1, 2 e 4 semanas. A estabilidade dos analitos foi avaliada empregando-se os testes F e teste t de Student com um nível de 95% de confiança.

A robustez foi estimada empregando o teste de Youden, que além de avaliar a robustez do método, também ordena a influência de cada fator no resultado final. Os fatores selecionados e seus níveis (valores nominais – letras maiúsculas e a variação – letras minúsculas) bem como a matriz ensaiada são mostrados na Tabela 2.5. A amostra selecionada para realizar o teste de Youden foi aquela sujeita a maior interferência da matriz (Boqueirão, P3), fortificadas no nível de $20 \mu\text{g L}^{-1}$.

TABELA 2.5 – FATORES, NÍVEIS E MATRIZ PARA O TESTE DE YOUTDEN NA INVESTIGAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO

Fator	Nominal				Variação			
Proporção do início do gradiente / %	15 (A)				16 (a)			
Quantidade de NaCl / g	1 (B)				0,9 (b)			
Quantidade de MgSO ₄ / g	1,5 (C)				1,6 (c)			
Quantidade de PSA / mg	30 (D)				32 (d)			
Quantidade de C18 / mg	50 (E)				48 (e)			
Tempo de centrifugação / min*	10/15 (F)				8/13 (f)			
Temperatura de secagem / °C	30 (G)				32 (g)			
Fatores	1	2	3	4	5	6	7	8
Proporção do início do gradiente / %	A(+)	A(+)	A(+)	A(+)	a(-)	a(-)	a(-)	a(-)
Quantidade de NaCl / g	B(+)	B(+)	b(-)	b(-)	B(+)	B(+)	b(-)	b(-)
Quantidade de MgSO ₄ / g	C(+)	c(-)	C(+)	c(-)	C(+)	c(-)	C(+)	c(-)
Quantidade de PSA / mg	D(+)	D(+)	d(-)	d(-)	d(-)	d(-)	D(+)	D(+)
Quantidade de C18 / mg	E(+)	e(-)	E(+)	e(-)	e(-)	E(+)	e(-)	E(+)
Tempo de centrifugação / min	F(+)	f(-)	f(-)	F(+)	F(+)	f(-)	f(-)	F(+)
Temperatura de secagem / °C	G(+)	g(-)	g(-)	G(+)	g(-)	G(+)	G(+)	g(-)
Resultados	s	t	u	v	w	x	y	z

*tempo de centrifugação na etapa de extração/clean-up.

Para avaliar o efeito de cada fator, a média dos valores nominais foi subtraída da média dos valores obtidos para variação ensaiada como mostra a Eq. 2.2 a seguir:

$$\text{Efeito Proporção do início do gradiente} \\ \frac{\sum A_i}{4} - \frac{\sum A_i}{4} = \frac{s + t + u + v}{4} - \frac{w + x + y + z}{4} \quad \text{Eq. 2.2}$$

O cálculo dos efeitos para cada fator estudado foi realizado de forma análoga.

Para avaliar a significância dos efeitos, a estimativa do erro experimental foi calculada a partir da realização de replicatas autênticas de cada ensaio:

$$s(\text{efeito}) = \sqrt{\frac{4s^2}{N}} \quad \text{Eq. 2.3}$$

onde s^2 é a variância agrupada de todos os efeitos, calculada de acordo com a Eq. 2.4:

$$s^2 = \frac{v_1 s_1^2 + v_2 s_2^2 + \dots + v_8 s_8^2}{v_1 + v_2 + \dots + v_8} \quad \text{Eq. 2.4}$$

na qual v_i é o número de graus de liberdade ($n_i - 1$).

Como o número de repetições foi o mesmo em todos os ensaios, a estimativa agrupada foi a média das variâncias obtidas para os ensaios individuais.

Um efeito só é considerado estatisticamente significativo quando o valor absoluto for superior a $t_{v=8} \times s(\text{efeito})$. O valor de t de Student para oito graus de liberdade e com 95% de confiança é igual a 2,306 (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

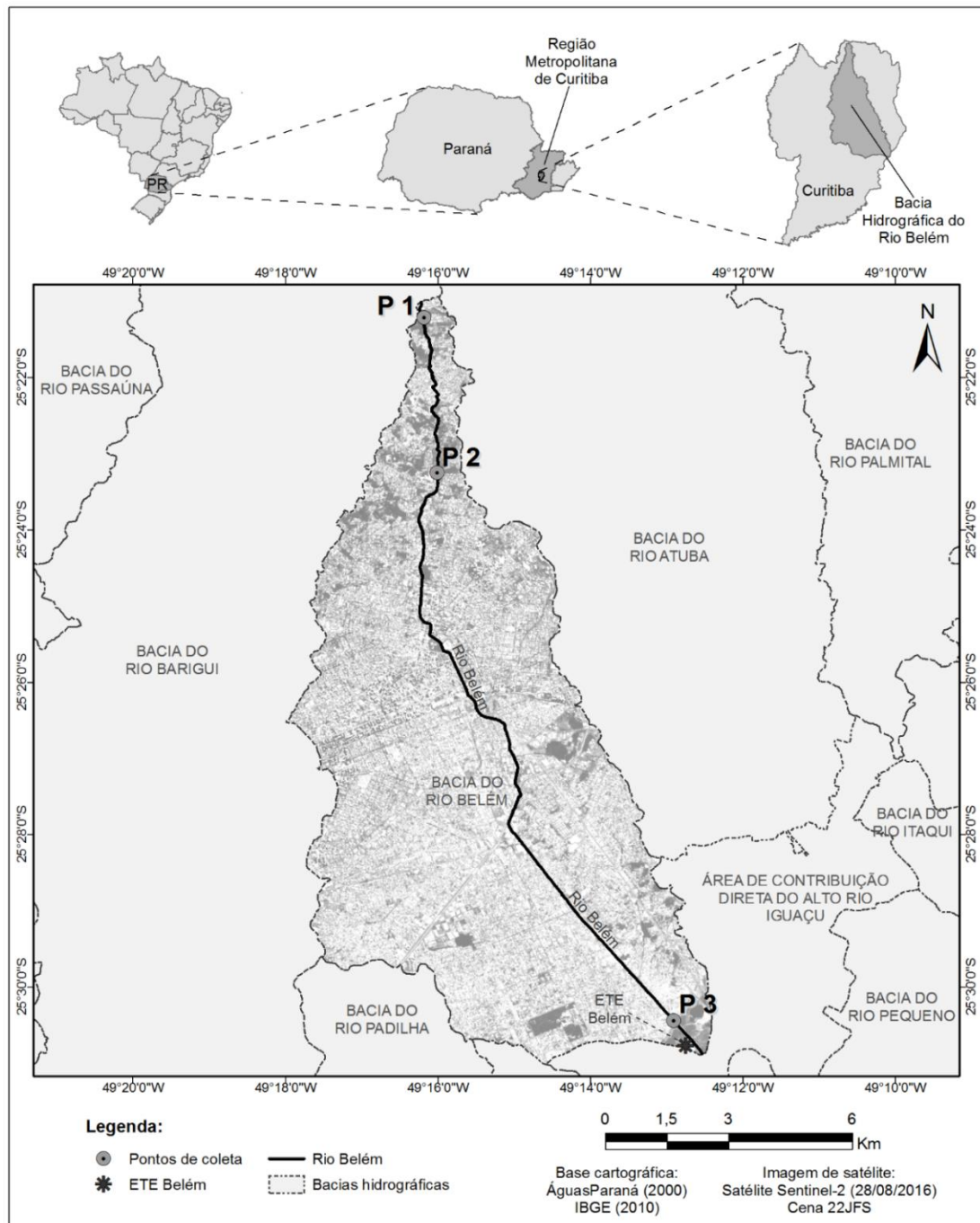
2.2.6 Amostras reais

A sub-bacia do rio Belém foi selecionada para ser analisada neste trabalho por ser uma das mais importantes da cidade de Curitiba, com extensão de 17,13 km. Nasce no bairro Cachoeira, atravessa a cidade de norte a sul, cortando regiões de alto grau de densidade populacional como bairros periféricos das Zonas Norte e Sul e a Zona Central da cidade, até desaguar no rio Iguaçu, no bairro Boqueirão (BOLLMANN; EDWIGES, 2008).

O primeiro ponto (P1) de amostragem foi a 500 m da nascente, nas proximidades do Parque Municipal Nascentes do Belém. O segundo ponto (P2) foi no Parque São Lourenço, a 5,4 km da nascente. E o terceiro ponto de coleta (P3) foi realizado próximo a foz do rio Belém no Boqueirão (Figura 2.1). O pH das amostras coletadas variou entre 6,7 a 8,1.

As amostras de água foram coletadas em frascos de vidro âmbar de 4 L previamente limpos e secos, ambientado com a água a ser coletada. A cada frasco foram adicionados 4 mL de metanol para inibir o crescimento microbiano. As amostras foram então filtradas utilizando filtro de fibra de vidro GF3 de 55 mm e 0,60 µm de poro (Macherey Nagel) para remoção do material particulado e guardadas sob refrigeração em frascos âmbar a 4 °C por um período máximo de 72 horas. O pH das amostras foi medido após a filtração.

FIGURA 2.1 - LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS DE AMOSTRAGEM NO RIO BELÉM.



Quatro campanhas amostrais foram realizadas para avaliar a influência da sazonalidade no método proposto (Julho2016/inverno, Novembro2016/primavera, Janeiro2017/verão, Abril2017/outono e Agosto2017/inverno).

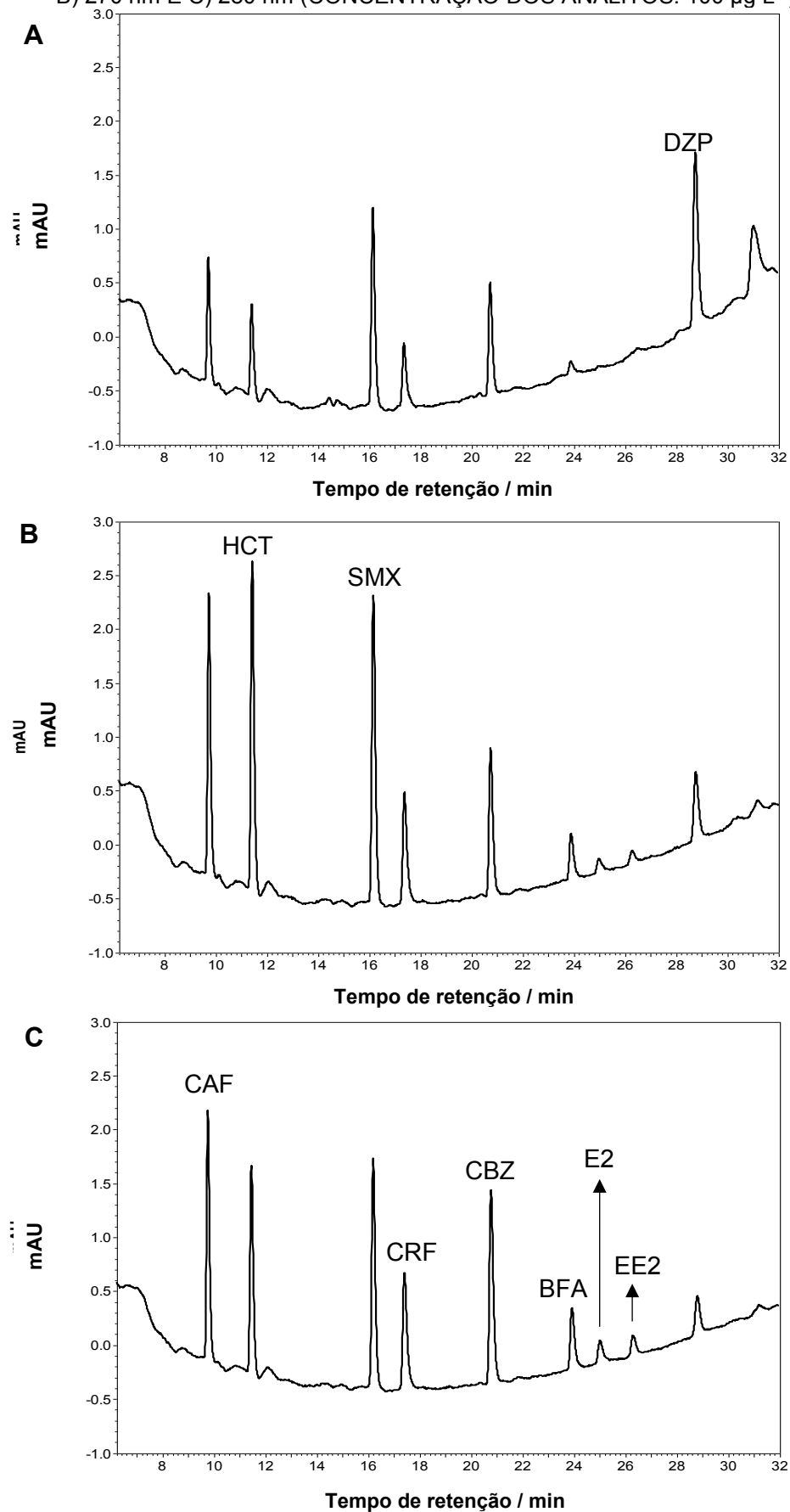
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Otimização das condições cromatográficas

Para a determinação simultânea dos fármacos selecionados, a otimização da fase móvel representa uma etapa crucial para a obtenção de boa resolução cromatográfica em menor tempo de análise. Dessa forma, foram realizados primeiramente ensaios qualitativos com base em informações contidas na literatura acerca da melhor constituição da fase móvel, empregando misturas de metanol, acetonitrila, água e tampão fosfato em pH ácido. Ainda, diferentes vazões, gradientes e comprimentos de onda foram investigados.

A separação mais adequada dos nove analitos foi conseguida com água e acetonitrila em eluição por gradiente, vazão de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura mantida em $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Sob essas condições, os cromatogramas apresentados na Figura 2.2 mostram a separação dos nove compostos em tempo de análise de 32 minutos. De acordo com os espectros UV obtidos pelo DAD, os comprimentos de onda nos quais os valores de absorbância foram os máximos passíveis de obtenção foram fixados para detecção dos analitos: 254 nm para DZP, 270 nm para HCT e SMX, e 280 nm para CAF, CRF, CBZ, BFA, E2 e EE2.

FIGURA 2.2 - CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA O MÉTODO CROMATOGRÁFICO LC-DAD OTIMIZADO EM CADA UM DOS COMPRIMENTOS DE ONDA AVALIADOS A) 254 nm, B) 270 nm E C) 280 nm (CONCENTRAÇÃO DOS ANALITOS: $100 \mu\text{g L}^{-1}$).



É possível observar que a intensidade dos sinais para BFA, E2 e EE2 são bastante inferiores aos demais compostos analisados (menor absorvidade molar). Isso reflete na menor sensibilidade obtida quando curvas analíticas foram construídas em solvente (proporção inicial da fase móvel 15:85 ACN:H₂O) mostrados na Tabela 2.6.

TABELA 2.6 - FIGURAS DE MÉRITO PARA A DETERMINAÇÃO DOS FÁRMACOS, HORMÔNIOS E BISFENOL A EMPREGANDO O MÉTODO CROMATOGRÁFICO OTIMIZADO (CURVA ANALÍTICA EM SOLVENTE)

Analito	$\lambda_{\text{DAD}}^*/\text{nm}$	Equação Curva analítica	R^2	$t_{\text{R}}^{**}/\text{min}$	$\text{LOD}^{***}/\mu\text{g L}^{-1}$	$\text{LOQ}^{***}/\mu\text{g L}^{-1}$
CAF	280	$A_p = 416,2 c_{\text{CAF}} - 217,9$	0,9999	9,6	2,8	8,3
CRF	280	$A_p = 276,8 c_{\text{CRF}} - 1268$	0,9998	17,3	5,4	16,5
CBZ	280	$A_p = 445,8 c_{\text{CBZ}} - 1474$	0,9999	20,7	4,4	13,5
HCT	270	$A_p = 599,9 c_{\text{HCT}} - 953,1$	0,9999	11,4	3,8	10,8
BFA	280	$A_p = 129,8 c_{\text{BAF}} + 877,6$	0,9999	24,2	3,0	9,10
E2	280	$A_p = 54,78 c_{\text{E2}} - 144,5$	0,9993	25,3	6,5	19,7
EE2	280	$A_p = 54,19 c_{\text{EE2}} - 628,0$	0,9994	26,6	4,9	14,9
SMX	270	$A_p = 614,6 c_{\text{SMX}} - 1582$	0,9999	16,6	7,2	21,7
DZP	254	$A_p = 489,2 c_{\text{DZP}} - 4256$	0,9999	28,6	6,7	20,3

* λ_{DAD} : comprimento de onda monitorado

** t_{R} : tempo de retenção

***LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação; calculados com base nos parâmetros da curva analítica (ICH, 2005)

As curvas em solvente foram inicialmente construídas para verificar a faixa de resposta linear, principalmente para as concentrações mais baixas, a fim de estipular um valor de concentração quantificável para as fortificações realizadas no decorrer da otimização do método de extração. Além disso, os LOD e LOQ foram estipulados por meio dos parâmetros da curva analítica para estimar o limite instrumental de detecção e quantificação dos analitos.

2.3.2 Otimização do método QuEChERS via planejamento fatorial

2.3.2.1 Planejamento Plackett-Burman

O planejamento fatorial fracionário de dois níveis Plackett-Burman é, geralmente, utilizado para investigação dos fatores principais que mais influenciam um sistema contendo inúmeras variáveis. O QuEChERS é um sistema que apresenta

diversas etapas e fatores que influenciam na extração de compostos, sendo o planejamento P-B bastante apropriado para o *screening* inicial das variáveis mais importantes. A redução do número experimento é drástica neste tipo de planejamento. Em um planejamento completo, seriam necessários 256 experimentos para otimizar simultaneamente 8 fatores, ao passo que no planejamento P-B, apenas 12 ensaios são necessários. De acordo com essas informações e com o levantamento bibliográfico, oito variáveis foram selecionadas para avaliação do método de extração (Tabela 2.2).

Após a realização do experimento de acordo com a matriz do planejamento P-B (Tabela 2.3), os resultados obtidos em termos de recuperação estão na Tabela 2.7. É possível observar que para alguns analitos valores de recuperação superiores a 120% foram obtidos, o que pode refletir uma maior interferência da matriz.

TABELA 2.7 - RECUPERAÇÕES OBTIDAS EMPREGANDO PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN PARA *SCREENING* DAS VARIÁVEIS DO MÉTODO QuEChERS (AMOSTRA FORTIFICADA COM 20 µg L⁻¹ DOS ANALITOS, EXCETO HCT (45 µg L⁻¹))

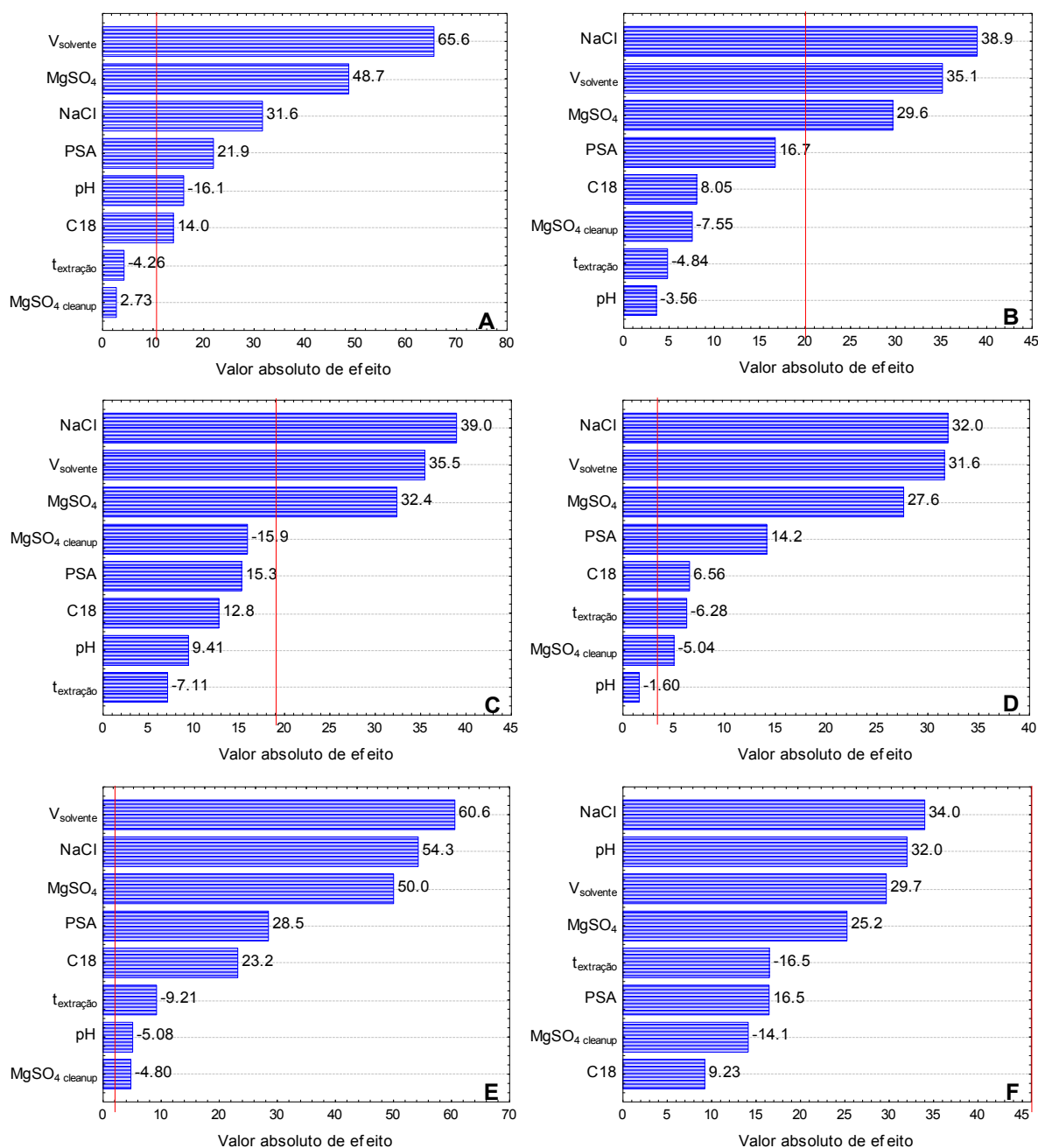
Ensaio	Recuperação / %								
	CAF	CBZ	CRF	HCT	BFA	E2	EE2	SMX	DZP
1	155	111	102	97	182	80	108	97	133
2	136	89	102	83	161	104	104	60	188
3	126	110	115	92	171	72	88	90	125
4	126	107	130	90	182	120	123	62	126
5	131	83	95	73	141	86	114	54	89
6	158	99	97	86	174	68	101	82	111
7	119	108	127	95	178	132	148	64	137
8	52	58	64	47	96	68	66	19	66
9	30	20	27	18	47	25	33	8	16
10	132	91	97	77	163	70	31	74	94
11	118	75	78	65	146	52	63	58	88
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	126	107	117	95	172	110	160	54	97
14	121	97	108	95	172	101	173	54	143
15	125	99	113	93	171	89	173	55	138

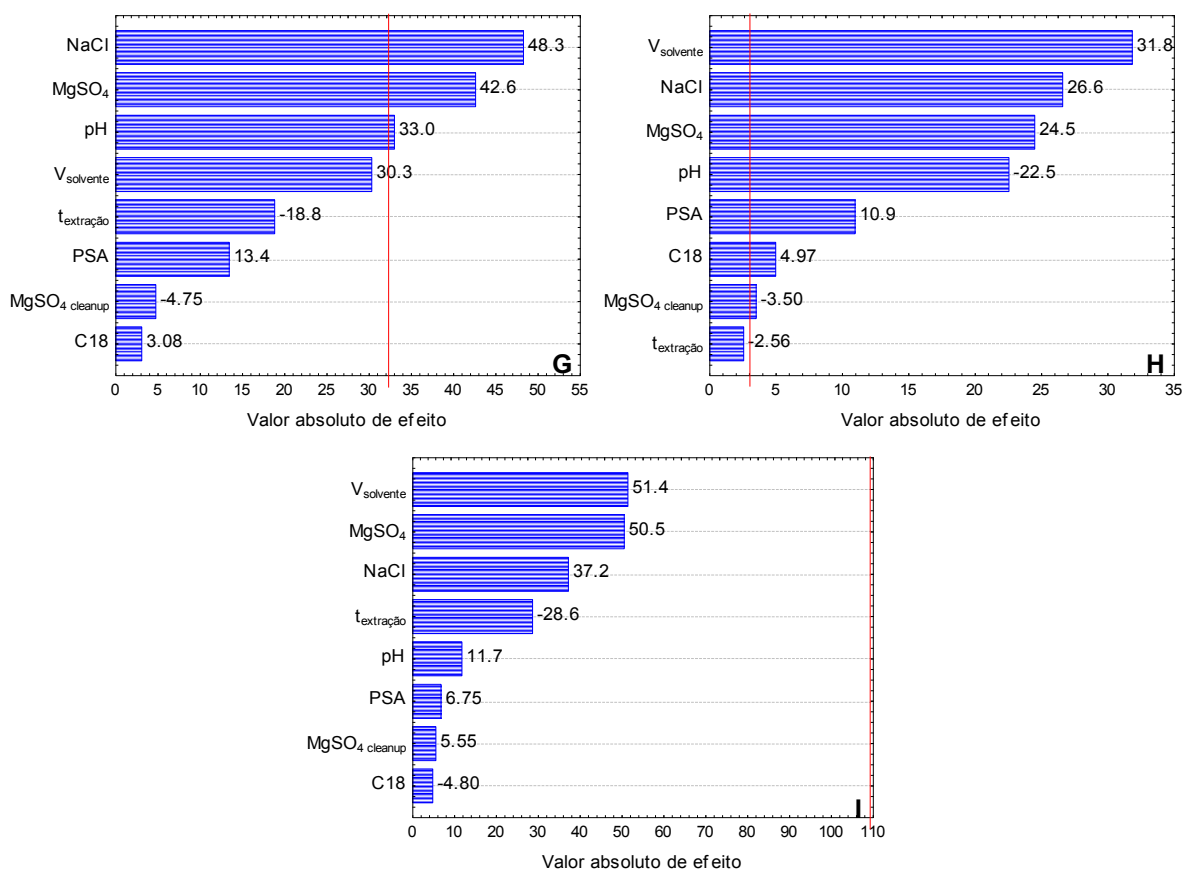
O ensaio 12 apresentou problemas em relação a separação das fases na etapa de extração, não sendo coletada a alíquota de acetonitrila para etapa de *clean up*.

O cálculo dos efeitos principais e sua avaliação através da ANOVA com 95% de confiança foram realizados e os resultados são mostrados através dos gráficos de Pareto em termos de valores absolutos de efeito (Figura 2.3). É importante ressaltar

que o planejamento P-B permite apenas o cálculo dos efeitos principais das variáveis, pois apresenta número reduzido de experimentos e os efeitos de ordem superior estão confundidos, sendo de difícil interpretação.

FIGURA 2.3 - GRÁFICOS DE PARETO PARA OS EFEITOS PRINCIPAIS (VALORES ABSOLUTOS) A PARTIR DO PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN PARA A) CAF, B) CBZ, C) CRF, D) HCT, E) BFA, F) E2, G) EE2, H) SMX E I) DZP. O NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA PARA CADA ANALITO É REPRESENTADO PELA LINHA VERTICAL VERMELHA.





Para a maioria dos compostos analisados os fatores mais significativos (efeito positivo) foram: a quantidade de MgSO₄, NaCl, volume de solvente e quantidade de amina primária secundária – PSA.

A quantidade de MgSO₄ e NaCl influenciam diretamente no efeito *salting out* da etapa de extração. Anastassiades et al. (2003), durante a proposição do método original, já levantaram a hipótese em relação a dualidade de comportamento desses sais (ANASTASSIADES et al., 2003). Entre os sais testados pelos propositores do método, o MgSO₄ anidro resultou em melhores recuperações, especialmente para analitos mais polares. Os autores ainda afirmaram que a adição de NaCl ajuda a controlar a seletividade da extração. Por outro lado, a adição de excesso de NaCl no sistema resultou em menor volume de fase de acetonitrila recuperada após o *salting-out* (SCHENCK et al., 2002). Tais antecedentes mostram a importância de se investigar as quantidades adequadas desses sais para um determinado conjunto de analitos e amostra.

Em relação ao efeito do sorvente (PSA), sua estrutura bidentada proporciona um elevado efeito quelante, retendo, através de ligações de hidrogênio, ácidos graxos livres e outros compostos polares presentes na matriz como açúcares, lipídios e

corantes (ANASTASSIADES et al., 2003). Como as amostras utilizadas provém de um rio considerado poluído (ou muito poluído em alguns trechos) (BOLLMANN; EDWIGES, 2008), inúmeros são os compostos destas classes a serem removidos. Deste modo, a influência significativa deste parâmetro reflete a necessidade de eliminar coextrativos mais polares da matriz. Ainda, como a concentração de interferentes pode variar de acordo com a amostra, atenção especial deve ser dada a essa variável para evitar a saturação da PSA, necessitando de quantidades maiores deste fator (ANASTASSIADES et al., 2003).

O volume de solvente, por sua vez, altera significativamente o fator de concentração dos analitos no extrato de acetonitrila, uma vez que a razão entre amostra e volume de ACN não foi mantida em 1:1, como indicado pelos autores do método original. Entretanto, recuperações adequadas foram obtidas quando empregaram razão 2:1 (ANASTASSIADES et al., 2003), evidenciando a potencialidade de se estudar tal fator. Dessa forma, foi preferível estudar este fator de forma isolada para avaliar seus reais efeitos sobre a recuperação dos analitos.

No caso da influência do pH, era esperada maior significância devido a diferença de constantes de acidez dos analitos. Entretanto, este efeito foi significativo para apenas quatro analitos (SMX, BFA e CAF (efeito negativo) e EE2 (efeito positivo)). Para SMX, a proximidade entre o pH no nível inferior avaliado (5,5) e seu pKa (6,2), reflete em recuperações mais adequadas deste analito uma vez que as moléculas se encontram na sua forma não-ionizada. Por meio do gráfico de distribuição das espécies, foi possível confirmar essa hipótese sendo que em pH 5,5, menos de 20% da SMX está ionizada. Já quando se tem pH 7,0 e 8,5, mais de 85% e 98% da molécula se encontra na sua forma ionizada. Assim, um aumento no valor de pH da amostra influencia negativamente na sua recuperação. No caso do EE2 (pKa 10,3), as frações da molécula ionizada e não ionizada não mudam muito na faixa de pH avaliada (em pH 8,5 apenas 1,6% de EE2 está ionizado). Apesar de apresentar efeito positivo, este valor foi muito próximo da linha de significância para esse analito, tendendo a uma menor influência na recuperação. Para BFA e CAF, é difícil estimar a extensão do efeito do pH uma vez que foram os analitos mais influenciados pela matriz. Optou-se, portanto, por manter o pH no valor do ponto central (7,0), o qual é próximo do pH encontrado nas amostras ($\approx 6,5$), evitando o acréscimo de mais uma etapa de manipulação de amostra.

Como os demais fatores estudados (tempo de extração, quantidade de C18 e MgSO_4 na etapa de *clean-up*) foram considerados de menor influência no sistema de extração, eles foram mantidos de acordo com a tendência indicada pelos gráficos de Pareto: tempo de extração de 1 min (-), 50 mg de C18 (+) e 100 mg de $\text{MgSO}_{4\text{clean-up}}$ (+).

2.3.2.2 Planejamento Composto Central

A partir das variáveis de maior significância indicadas pelo planejamento P-B, uma otimização através de um planejamento 2^3 composto central com quintuplicata do ponto central foi realizada (Tabela 2.4). Os novos níveis selecionados foram baseados na tendência positiva mostrada pelo planejamento anterior, isto é, maiores quantidades de MgSO_4 , NaCl e PSA indicavam uma recuperação mais adequada para a maioria dos analitos. Com isso, os valores correspondentes ao maior nível no planejamento P-B foram estudados no menor nível (-1) do CCD. Como a quantidade de solvente não foi avaliada, manteve-se a razão amostra/solvente de 1:1 (5,0 mL de água/5,0 mL de ACN). Os resultados obtidos em termos de recuperação para cada analito foram dispostos na Tabela 2.8.

Recuperações satisfatórias foram observadas para a maioria dos analitos, exceto para o DZP, para o qual valores superiores a 120% foram obtidos. Foi constatado no cromatograma a presença de uma substância que coeluiu com o DZP. Mesmo após a otimização do método de extração, o interferente não foi removido da amostra aquosa. Apesar da análise das amostras ser realizada dentro de 72 h após a coleta, o crescimento microbiano pode ter iniciado, uma vez que tal composto não aparecia nas amostras analisadas anteriormente e se observou a formação de corpos estranhos na solução da amostra. Como até 30% de interferência cromatográfica é tolerável, os dados foram mantidos.

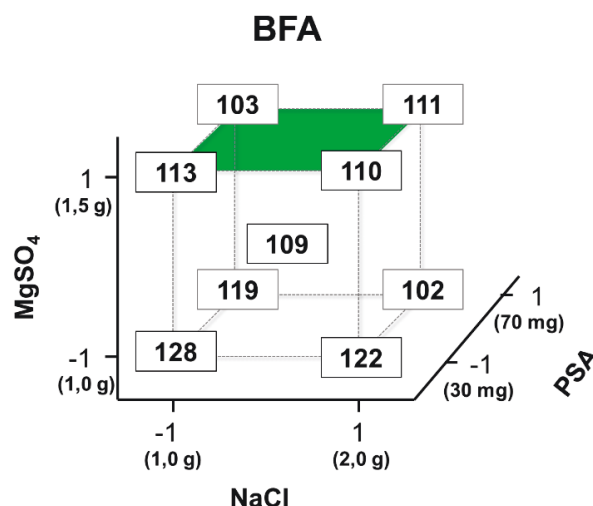
A partir das respostas obtidas para a recuperação de cada analito, realizou-se o cálculo dos efeitos e uma avaliação dos modelos matemáticos (superfícies de resposta) foi obtida a partir da Análise de Variância (ANOVA) com 95% de confiança.

TABELA 2.8 - RECUPERAÇÕES OBTIDAS PARA OS ANALITOS EM ESTUDO NO ENSAIO DE OTIMIZAÇÃO EMPREGANDO PLANEJAMENTO 2³ COMPOSTO CENTRAL (AMOSTRA FORTIFICADA COM 20 µg L⁻¹ DOS ANALITOS, EXCETO HCT (45 µg L⁻¹) E SMX (65 µg L⁻¹))

Ensaio	Recuperação / %								
	CAF	CBZ	CRF	HCT	BFA	E2	EE2	SMX	DZP
1	88	77	104	78	128	101	122	84	11
2	95	86	109	74	113	113	138	85	5
3	85	84	101	77	122	142	127	71	275
4	101	87	106	74	110	128	142	68	258
5	86	83	110	77	119	111	112	70	208
6	95	87	104	74	103	100	117	70	171
7	88	79	96	68	103	112	127	60	201
8	91	88	98	74	111	91	109	67	198
9	97	93	106	75	103	98	108	69	200
10	86	88	84	73	94	123	122	65	306
11	91	89	95	68	101	114	125	76	149
12	86	88	93	73	102	128	128	68	254
13	93	87	85	66	121	85	125	74	122
14	89	92	109	66	112	112	129	61	226
15	81	90	112	68	109	112	129	64	178
16	90	90	104	69	109	124	120	72	168
17	87	90	103	70	110	116	126	68	184
18	86	88	93	68	108	107	126	71	150
19	85	91	101	68	110	98	121	68	147

Para CAF, CRF e E2 nenhum efeito significativo foi observado. Apenas um efeito principal significativo foi observado para os analitos CBZ (MgSO₄ positivo) e HCT (NaCl negativo). Estes efeitos indicam que, no caso da CBZ, aumentando a quantidade de MgSO₄ maior a recuperação deste analito (ensaio 8), enquanto que para HCT, quanto menor a quantidade de NaCl, maior recuperação (ensaio 1). Efeitos principais e de interação foram observados para EE2, PSA (-16,1) e MgSO₄ x PSA (-10,9). No caso do BFA, apenas o efeito de interação entre NaCl e PSA não se mostrou significativo para a recuperação. Como existe um efeito de terceira ordem significativo (MgSO₄ x NaCl x PSA), as interpretações geométricas são ferramentas mais úteis para a visualização dos efeitos (Figura 2.4).

FIGURA 2.4 - GRÁFICOS PARA INTERPRETAÇÃO GEOMÉTRICA DOS EFEITOS DE INTERAÇÃO DE TERCEIRA ORDEM DO PLANEJAMENTO CCD PARA BFA



As maiores diferenças na recuperação de BFA podem ser observadas quando se passa do nível inferior para o superior de MgSO_4 (face superior do cubo, em verde), para a qual recuperações mais adequadas (até 120%) são obtidas. Provavelmente nessa região, a extração QuEChERS pode ser considerada mais seletiva para BFA, eliminando a influência de interferentes e coextrativos observados em outras condições ensaiadas. Entretanto, a ANOVA para esses resultados apontou falta de ajuste para os modelos lineares e quadráticos desenvolvidos.

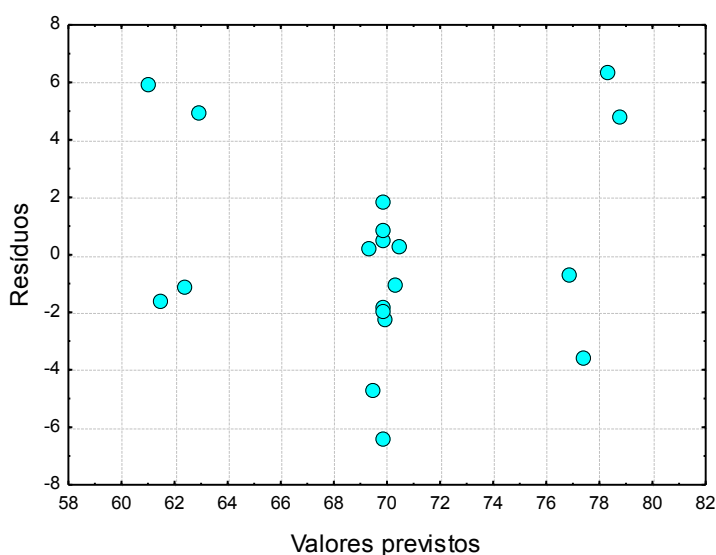
O único modelo passível de ser construído foi observado para SMX, para o qual os efeitos principais de NaCl e PSA foram significativos (ambos negativos). A significância do modelo linear foi verificada pela ANOVA (Tabela 2.9).

TABELA 2.9 - ANOVA PARA O MODELO LINEAR CONSTRUÍDO COM AS RECUPERAÇÕES OBTIDAS NO PLANEJAMENTO PARA SMX (CONCENTRAÇÃO DA SMX: $65 \mu\text{g L}^{-1}$)

Fonte de regressão	Soma quadrática (SQ)	Graus de liberdade (ν)	Média quadrática (MQ)	Teste F
Regressão (R)	511	3	170	11,3
Resíduos (r)	221	15	15	
Falta de ajuste (faj)	180	11	16	1,6
Erro puro (ep)	41	4	10	
Total	732	18		
% de variância explicada = 70				
% máxima de variância explicável = 94				

O modelo linear obtido apresentou % de variância explicada ($SQ_R/SQ_{total} = 0,7$) satisfatória considerando que a concentração do SMX está próxima ao LOQ do método em uma matriz bastante complexa. Além disso, a regressão foi significativa uma vez que a razão MQ_R/MQ_r (11,3) foi superior ao valor de $F_{tab} (v = 3,15) = 3,29$. A falta de ajuste do modelo ($MQ_{faj}/MQ_{ep} = 1,6 < F_{tab} (v = 11,4) = 5,94$) não foi significativa. Além disso, baixos valores de resíduos com distribuição aleatória foram observados, confirmando uma boa qualidade do ajuste linear (Figura 2.5).

FIGURA 2.5 - GRÁFICO DOS RESÍDUOS VERSUS VALORES PREVISTOS PELO MODELO LINEAR.



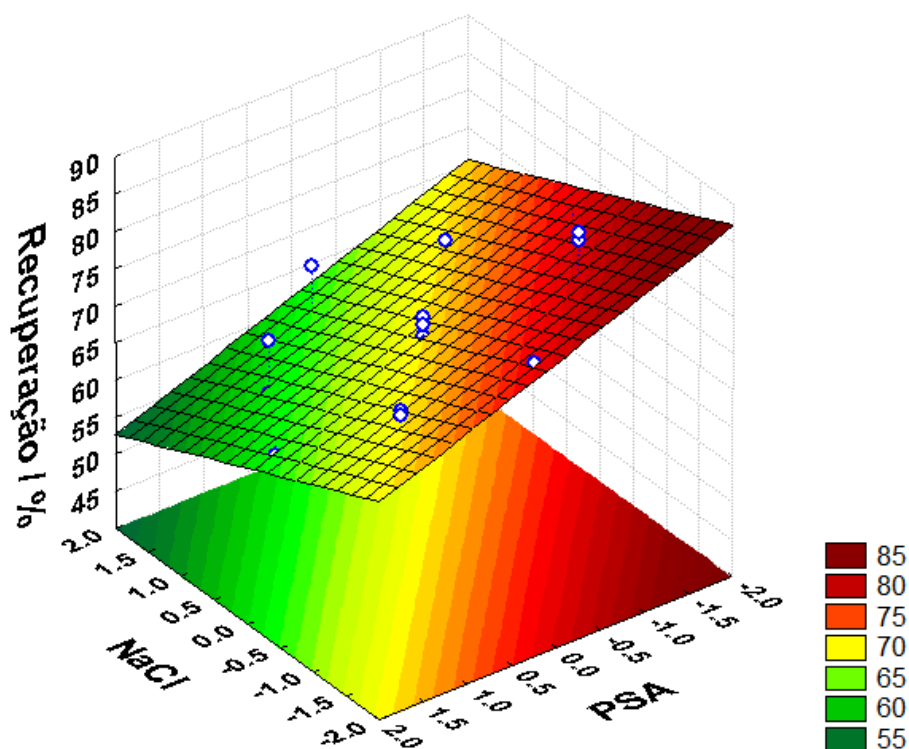
O ajuste da expressão semiempírica com 95% de nível de confiança para o modelo linear obtido pode ser representado pela Eq. 2.5:

$$Y = 69,9 - 4,16 X_1 - 4,48 X_2 \quad \text{Eq. 2.5}$$

onde Y é a recuperação de SMX, X_1 e X_2 a quantidade de NaCl e PSA, respectivamente. Em função do modelo linear ser válido de acordo com os parâmetros da ANOVA, foi construída a superfície de resposta (Figura 2.6) que evidencia a dependência da recuperação do SMX com a quantidade de NaCl e PSA no procedimento de extração QuEChERS.

As cores quentes (tons de vermelho, menor quantidade de NaCl e PSA) representam as maiores faixas de recuperação obtidas para SMX, enquanto que cores frias (verde) correspondem a menores taxas de recuperação.

FIGURA 2.6 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA LINEAR PARA RECUPERAÇÃO DA SMX EMPREGANDO QUECHERS EM FUNÇÃO DOS FATORES QUANTIDADE DE NaCl E PSA (QUANTIDADE DE MgSO_4 MANTIDA NO PONTO CENTRAL).



Apesar da impossibilidade de construir modelos semelhantes para os demais analitos, essa tendência também foi observada para os demais compostos. Dessa forma, a condição ideal de extração empregando QuEChERS foi otimizada com sucesso: 1,5 g de MgSO_4 , 1,0 g de NaCl e 30 mg de PSA.

Apesar do planejamento P-B ter indicado que um aumento na quantidade de todos os fatores significativos era uma tendência para melhorar recuperação dos analitos, a otimização via CCD mostrou que, em grande parte dos ensaios, recuperações menos adequadas foram obtidas. Este fato demonstra a real necessidade de se otimizar a metodologia através de planejamentos fatoriais e a impossibilidade de extrapolar as tendências fora das faixas estudadas.

2.3.2.3 Otimização do volume de acetonitrila e de reconstituição

Após determinar as melhores condições de extração via CCD, investigou-se a possibilidade de pré-concentrar os analitos no método QuEChERS pela variação dos volumes de acetonitrila na etapa de extração e do volume de reconstituição após

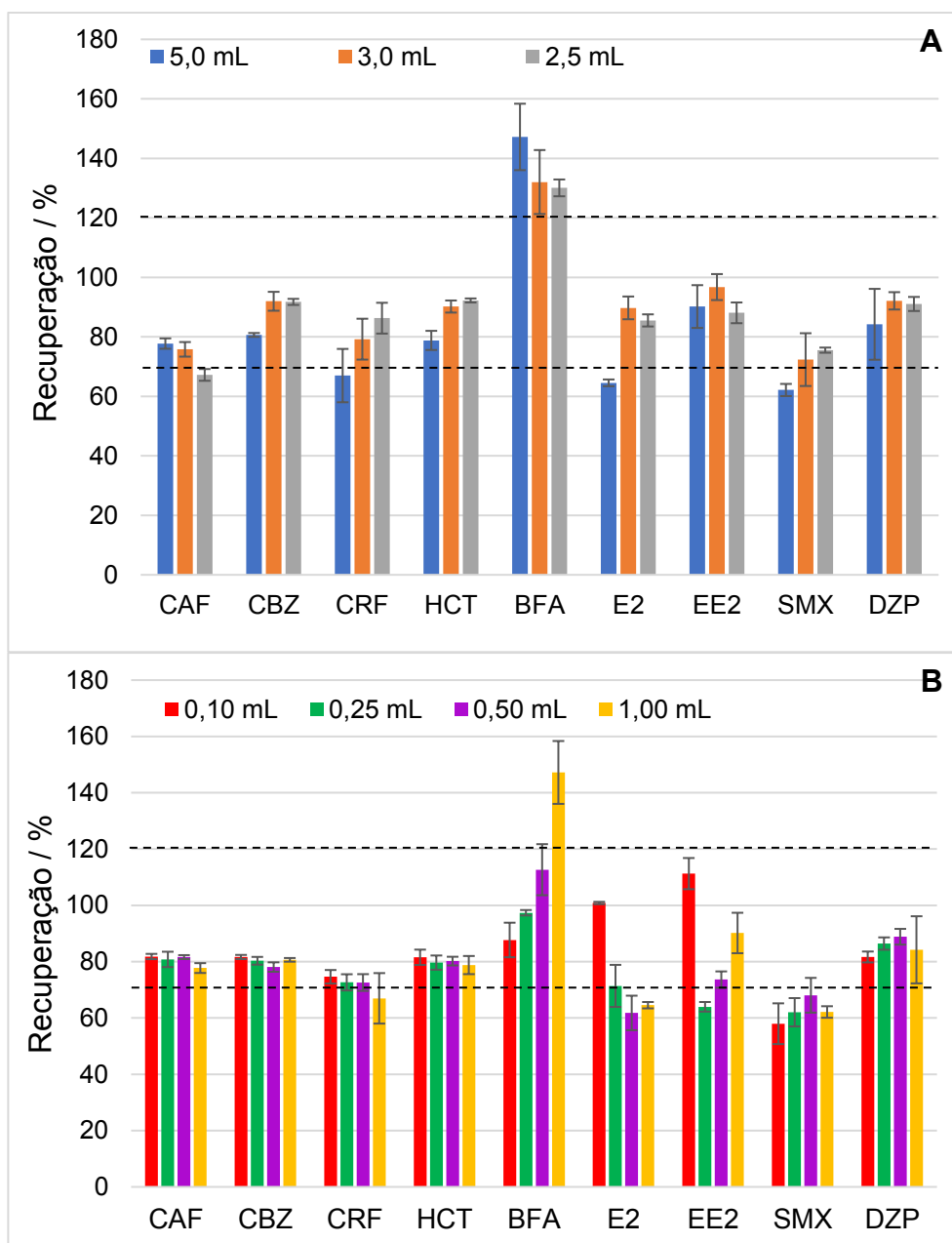
secagem com N₂. Existem poucos trabalhos na literatura que relatam a pré-concentração associada com o QuEChERS, a qual geralmente é alcançada pela combinação com as técnicas de extração em fase sólida e microextração líquido-líquido dispersiva (ROSSINI et al., 2016; WEI et al., 2015) ou através da etapa de evaporação da amostras e redissolução em um pequeno volume (DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ et al., 2013; XIONG et al., 2015).

A partir dessa perspectiva, avaliou-se, inicialmente, a redução do volume de acetonitrila na etapa de extração. Partindo de 5,0 mL de amostra, empregaram-se os volumes de 5,0, 3,0 e 2,5 mL de ACN. Vale ressaltar que o volume adicionado de ACN não pode ser completamente recuperado após o *salting out*, uma vez que parte da acetonitrila ainda permanece dissolvida na amostra, devido sua alta solubilidade em água ($> 800 \text{ g L}^{-1}$). Lehotay (2006) menciona que para medidas precisas e exatas obtidas a partir do QuEChERS, os resultados devem ser corrigidos em termos dessas diferenças e flutuações de volume pela utilização de um padrão interno (LEHOTAY, 2006). Para contornar este problema, entretanto, os resultados obtidos foram corrigidos em relação ao volume coletado de acetonitrila após a separação das fases na extração. Por exemplo, para a adição de 2,5 mL de ACN, apenas 2,0 mL foram coletados, valor esse utilizado nos cálculos que ainda empregavam a curva realizada em solvente. A quantidade total de ACN expulsa foi, em média, 2,14 mL (medida com auxílio de uma microseringa), sendo então, que poucos microlitros foram perdidos nesse procedimento. É importante destacar ainda que, após a otimização de todo o processo de extração, curvas por superposição de matriz foram realizadas, as quais corrigem os problemas relacionados a flutuação das recuperações obtidas empregando curva analítica externa.

Empregando os diferentes volumes de ACN, a recuperação se manteve adequada dentro da faixa de 70 a 120% para a maioria das espécies de interesse, exceto BPA, que apresentou recuperações acima de 120% (Figura 2.7A).

No caso específico desse analito, ao reduzir o volume de ACN, a recuperação e o desvio se aproximaram de valores mais adequados. Observou-se uma queda considerável no RSD para a maioria dos analitos quando 2,5 mL foi empregado como volume de extração (RSD $< 6,0\%$). O caso mais evidente foi para o DZP, no qual, passando de 5,0 para 2,5 mL, houve uma redução no RSD de 11,9 para 2,37%.

FIGURA 2.7 - OTIMIZAÇÃO DO A) VOLUME DE SOLVENTE NA ETAPA DE EXTRAÇÃO E B) VOLUME DE RECONSTITUIÇÃO EMPREGADOS NO MÉTODO QuEChERS (VOLUME DE AMOSTRA: 5,0 mL; VOLUME DE RECONSTITUIÇÃO OTIMIZADO EMPREGANDO 5,0 mL DE ACN NA ETAPA DE EXTRAÇÃO).



Essa modificação do método QuEChERS ainda é pouco explorada na literatura. Bedassa et al. (2015) modificaram o método QuEChERS para a determinação de agrotóxicos em amostras de frutas na Etiópia. No estudo, avaliaram-se a diminuição do volume de acetonitrila empregada na extração (comumente 10 mL) para promover a pré-concentração dos analitos, o que foi conseguido utilizando 2,5 mL de ACN (recuperações entre 78 – 118%) (BEDASSA; GURE; MEGERSA, 2015).

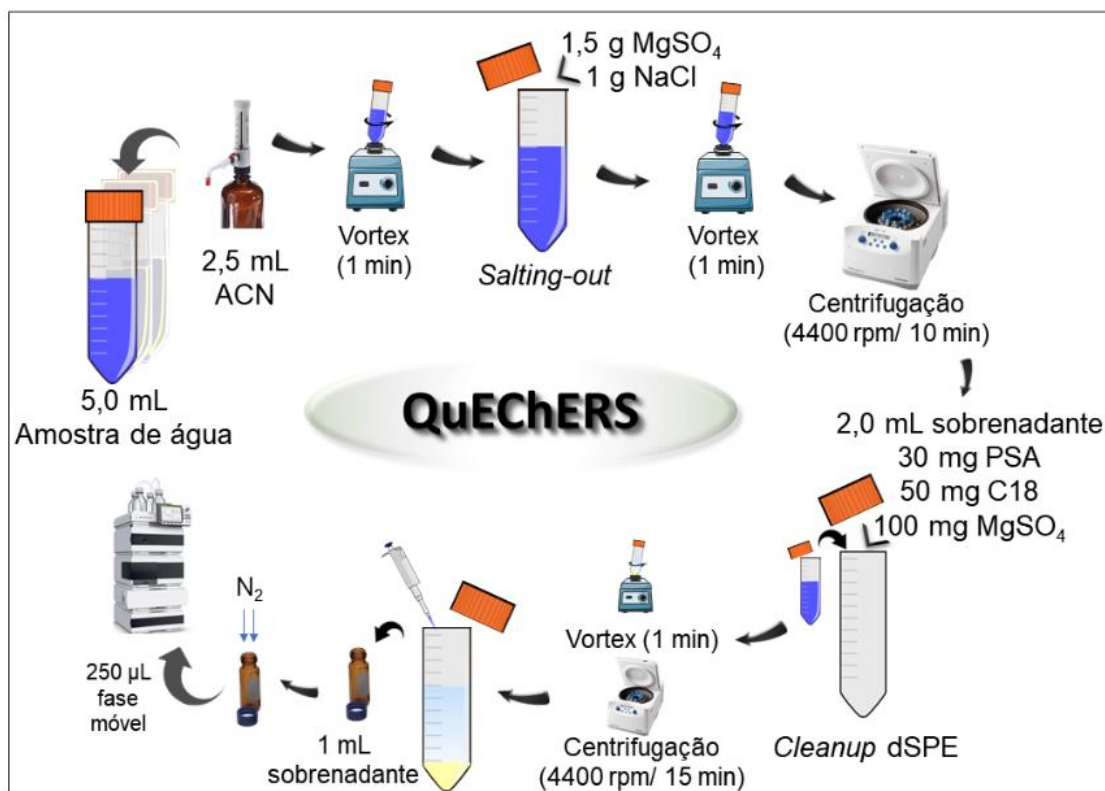
A redissolução da amostra também pode agregar uma taxa de concentração ao processo de extração. Os volumes de fase móvel (15:85 H₂O:ACN) investigados para a redissolução, em ordem decrescente, foram 1,0 mL, 500, 250 e 100 µL (Figura 2.7B). Os valores de recuperação se mantiveram novamente dentro da faixa esperada, exceto para SMX, abaixo de 70% na maioria dos volumes estudados, e para o BFA, acima de 120% em 1,0 mL de volume de reconstituição. É pertinente observar que para a avaliação do volume de reconstituição, o volume de ACN na etapa de extração havia sido mantido em 5,0 mL, o que acarretou em grande desvio e taxas de recuperação superiores a 120% para o BFA (como evidenciado anteriormente). Menores volumes de reconstituição garantiram recuperações mais adequada para o BFA, mesmo empregando-se um maior volume de extrator. No caso da SMX, os valores baixos de recuperação podem ser readequados empregando 2,5 mL de ACN.

A fim de garantir a recuperação adequada para maioria dos analitos e com o menor desvio possível, 250 µL foi selecionado como volume de reconstituição.

O fator de concentração obtido é da ordem de dez vezes se considerando o volume de ACN coletado (analito em 5,0 mL da amostra aquosa extraído para 2,0 mL de solvente) e o volume final de 250 µL (a partir de 1,0 mL coletado após a etapa do *clean-up*). Apesar da pré-concentração ainda ser pequena quando comparada com outros métodos de extração como, por exemplo, na extração em fase sólida em que o analito pode ser concentrado de centenas a milhares de vezes, a investigação deste tipo de modificação favorece a determinação de analitos na concentração de traços por detectores com detectabilidade e seletividade inferiores a espectrômetros de massas, como é o caso do DAD.

Com base nos resultados obtidos para otimização dos principais parâmetros do método QuEChERS aplicado para extração de contaminantes emergentes de amostras de água superficial, o fluxograma da Figura 2.8 mostra as condições empregadas.

FIGURA 2.8 – FLUXOGRAMA DO MÉTODO QuEChERS OTIMIZADO PARA OS FÁRMACOS, HORMÔNIOS E BISFENOL A EM MATRIZES AQUOSAS



Apenas três trabalhos na literatura já propuseram a utilização de QuEChERS para extração de analitos de amostras de água – agrotóxicos (BRONDI et al., 2011; WU et al., 2013) e bifenilas policloradas (SHI et al., 2012). As condições utilizadas em tais trabalhos são mostradas na Tabela 2.10.

TABELA 2.10 - PRINCIPAIS PARÂMETROS E CONDIÇÕES OTIMIZADOS PARA O MÉTODO DE EXTRAÇÃO QuEChERS EM AMOSTRAS AQUOSAS

Quantidade de amostra	Volume ACN / mL	Sais	Sorvente <i>clean-up</i> / mg	Ref.
10 mL	15	0,5 g citrato de sódio dibásico 1,0 g citrato de sódio tribásico 4,0 g MgSO ₄ 1,0 g NaCl	PSA: 125	SHI et al., 2012
10 g	10	4,0 g MgSO ₄ 1,0 g NaCl	PSA: 330 C18: 330	BRONDI et al., 2011
10 mL	20	5,0 g NaCl	-	WU et al., 2013
5,0 mL	2,5	1,5 g MgSO ₄ 1,0 g NaCl	PSA: 30 C18: 50	Este trabalho

Brondi et al. (2011), utilizaram as mesmas quantidades propostas inicialmente por Anastassiades e Lehotay (2003) sem otimizá-las para seu sistema. Ainda, não realizaram a etapa de *clean-up* de acordo com o método QuEChERS, pois a alíquota coletada da extração foi passada por um cartucho convencional de extração em fase sólida contendo PSA, C18 e MgSO₄. Apesar disso, as recuperações obtidas para os agrotóxicos em água ficaram entre 63 e 116% sendo o RSD inferior a 12%.

Apesar de Wu et al. (2013) denominarem a técnica que utilizaram de QuEChERS para extração de agrotóxicos em amostras de água, o procedimento utilizado pode ser mais adequadamente denominado como extração líquido-líquido assistida por *salting out* (SALLE, do inglês *Salting out Liquid-Liquid Extraction*), por não apresentar etapa de *clean-up* que é característica do QuEChERS. Muitos autores que otimizam o método QuEChERS acabam por descaracterizá-lo, pois neste método há a junção de duas técnicas já bem estabelecidas na literatura: extração líquido-líquido assistida por *salting out* e extração em fase sólida dispersiva. A eliminação de uma dessas etapas configura a utilização das técnicas referidas de forma isolada e não poderiam ser denominadas como QuEChERS.

No trabalho de SHI et al. (2011), o método QuEChERS foi empregado para extração de PCB utilizando um kit comercial normatizado (EN 15662) contendo sais tamponantes (pH entre 5 e 5,5). Recuperações médias entre 95 e 109% foram obtidas para um nível de fortificação de 1,6 µg L⁻¹. Mesmo que o método tenha sido aplicado para amostra de água, as quantidades dos componentes do kit foram otimizadas para extração de agrotóxicos em amostras de alimentos, e, portanto, seria uma boa abordagem avaliar esses parâmetros para amostras de água.

Em especial, pode-se observar que a quantidade de sorventes é bem variável, e também representa o que há na literatura em relação a outras matrizes. O estabelecimento da quantidade adequada do sorvente é, em particular, um desafio para este tipo de amostra ambiental, pois existe uma grande variação em termos de concentração de interferentes dependendo da fonte amostrada. Outro detalhe é que grande parte dos custos relacionado ao QuEChERS provém do uso das fases sorventes. Dessa forma, a otimização é uma estratégia segura para garantir as melhores respostas com o mínimo de sorvente necessário, diminuindo os custos por amostra.

2.3.3 Validação do método

2.3.3.1 Estabilidade

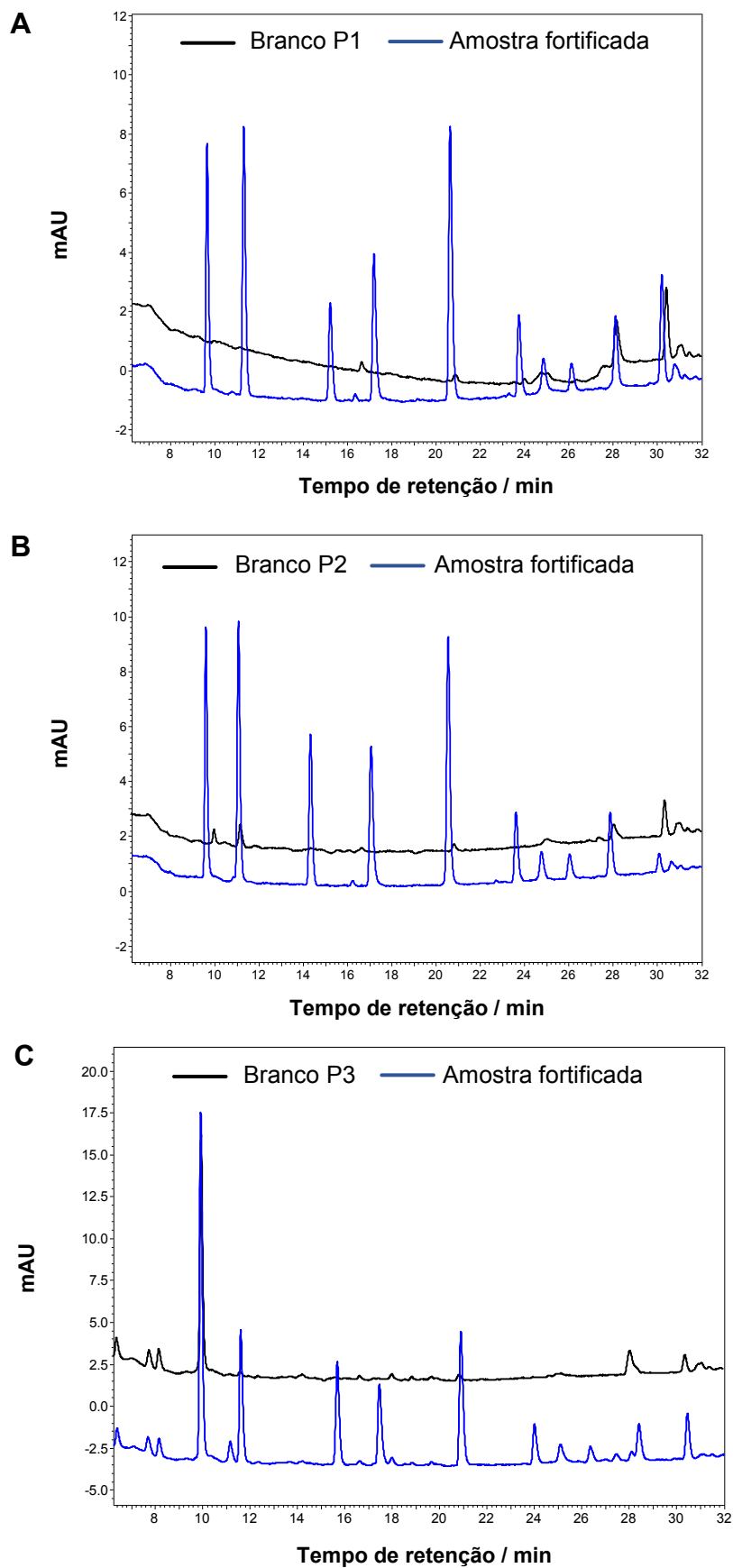
Nas condições usuais de armazenamento das soluções padrão (-20°C), o teste F revelou que não houve diferença significativa entre as variâncias dos ensaios realizados em 1, 2 e 4 semanas. Da mesma forma, para esses ensaios, o teste t mostrou que as médias obtidas a partir da solução recém preparada e da armazenada ao longo do período avaliado, não apresentavam diferenças estatisticamente significantes ($t_{\text{calculado}}$ entre 0,140 e 11,8; $t_{\text{crítico}} = 12,7$). As soluções armazenadas sob refrigeração (4°C) apresentaram estabilidade similar às aquelas armazenadas a -20°C. As demais formas de armazenamento não são indicadas para os analitos estudados, pois os resultados apresentaram diferença significativa para ambos os testes estatísticos para pelo menos um dos analitos estudados ($t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$). O provável motivo é que nessas condições de temperatura (20°C, na presença e ausência de luz) pode ocorrer a volatilização do solvente de preparo das soluções (metanol), variando a concentração dos analitos.

2.3.3.2 Seletividade

A comparação da matriz isenta dos analitos (branco da amostra) e da matriz fortificada foi realizada para investigar a seletividade. Nenhum interferente elui no mesmo tempo de retenção (t_R) dos analitos, exceto para a CAF, não sendo possível obter uma amostra isenta desse analito em P3 (Figura 2.9). A presença de outros compostos não determinados pode ser visualizada em t_R diferentes dos analitos.

A seletividade do método também foi avaliada através da comparação dos espectros dos padrões obtidos por DAD com os espectros dos mesmos em uma amostra fortificada. Foi possível observar que nos mesmos t_R , os espectros obtidos são idênticos ou muito similares.

FIGURA 2.9 - COMPARAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA EXTRATO BRANCO E AMOSTRA FORTIFICADA ($40 \mu\text{g L}^{-1}$) APÓS EXTRAÇÃO QuEChERS EM 280 nm PARA A) P1, B) P2 E C) P3



Além disso, o teste F (Tabela 2.11) entre as variâncias obtidas para triplicata em solução padrão e para as matrizes fortificadas em dois níveis de concentração indicou que o método pode ser considerado seletivo, uma vez que o valor de $F_{\text{calculado}}$ foi inferior ao $F_{\text{crítico}}$ (19,0 – unicaudal) para a maioria dos analitos e amostras. Em apenas quatro casos (valores destacados na tabela), o valor de $F_{\text{calculado}}$ foi superior ao $F_{\text{crítico}}$, indicando que existe diferença significativa de HCT e EE2 na menor concentração em P3 e para CBZ e EE2 no maior nível de concentração na matriz P2. No caso da HCT, um composto interferente apresentou tempo de retenção muito próximo deste analito, podendo ter impactado na avaliação da seletividade em P2. Para EE2, no caso da baixa concentração avaliada, o sinal cromatográfico foi bastante alargado, podendo ter influenciado no resultado da seletividade. Apesar disso, pode-se considerar o método seletivo para os compostos avaliados, apresentando desvios padrão relativos inferiores a 20%.

TABELA 2.11 - RESULTADOS PARA SELETIVIDADE DO MÉTODO QuEChERS-LC-DAD (n=3) PARA AMOSTRAS COLETADAS EM JULHO-2016

Amostra			CAF	CBZ	CRF	HCT	BFA	E2	EE2	SMX	DZP	
20 µg L ⁻¹ *	Padrão	RSD	3,40	2,23	4,673	3,00	7,24	8,21	1,76	4,72	2,95	
		Variância	0,25	0,08	1,078	1,43	0,28	0,72	0,16	4,68	0,34	
	P1	RSD	8,74	1,38	8,31	9,38	15,36	5,34	1,16	3,22	3,62	
		Variância	1,12	0,05	2,87	10,75	2,09	0,32	0,04	3,58	0,32	
		F _{calculado}	4,44	1,73	2,66	7,51	7,41	2,28	4,22	1,31	1,05	
	P2	RSD	0,92	5,19	16,60	11,87	20,59	16,90	4,87	1,83	5,80	
		Variância	0,04	0,78	12,58	16,28	1,14	1,03	0,68	0,81	1,31	
		F _{calculado}	6,17	9,89	11,68	11,37	4,03	1,43	4,29	5,79	3,86	
	P3	RSD	1,24	2,99	4,93	0,64	6,77	2,49	12,23	6,31	6,25	
		Variância	1,19	0,18	0,62	0,05	0,16	0,06	5,40	8,63	1,47	
		F _{calculado}	4,69	2,31	1,74	26,55	1,79	11,98	33,78	1,84	4,34	
	100 µg L ⁻¹	Padrão	RSD	0,68	0,92	3,08	1,13	3,62	7,67	0,40	3,00	1,33
			Variância	0,28	0,28	7,95	0,83	5,26	11,18	0,10	1,66	0,93
		P1	RSD	1,79	0,88	2,96	4,20	5,06	7,69	1,22	3,29	7,58
			Variância	1,33	0,42	6,95	11,90	10,75	12,55	0,52	8,49	16,81
F _{calculado}			4,76	1,52	1,14	14,41	2,04	1,12	5,25	5,11	18,06	
P2		RSD	0,22	3,34	3,50	1,57	1,68	25,48	5,03	2,21	2,88	
		Variância	0,05	7,05	8,38	1,08	0,73	7,99	2,37	1,08	5,31	
		F _{calculado}	6,23	25,28	1,05	1,30	7,21	1,40	24,17	1,54	5,71	
P3		RSD	0,68	1,37	3,42	0,91	4,88	12,84	1,52	1,66	2,52	
		Variância	1,03	0,86	8,69	0,40	10,12	60,90	1,70	0,62	3,40	
		F _{calculado}	3,68	3,06	1,09	2,08	1,92	5,45	17,36	2,68	3,65	

*exceto para HCT 45 µg L⁻¹ e SMX 65 µg L⁻¹

2.3.3.3 Linearidade

A utilização do MMQO exige a adequação dos dados frente a alguns parâmetros do método. Para que a regressão linear seja válida, além da relação linear entre a concentração e a área de pico, refletida no coeficiente de determinação (R^2), os resíduos precisam ser aleatórios, independentes e homocedásticos (distribuição constante). A avaliação desses parâmetros foi realizada para cada um dos analitos estudados em curvas de superposição de matriz para cada amostra e os resultados estão dispostos nas Tabelas 2.12 a 2.14.

As premissas do método foram satisfeitas para a maioria dos compostos analisados. Coeficientes de determinação bastante satisfatórios foram obtidos dentro da faixa linear estudada para todas as amostras ($R^2 > 0,9925$). As menores concentrações foram conseguidas para a curva construída na nascente (P1), o que já era esperado, devido a menor influência da matriz ou presença de menor quantidade de interferentes por ser um ponto localizado próximo a nascente do rio Bélem.

Em alguns casos, os resíduos não foram considerados homocedásticos (F calculado superior ao crítico, destacados nas tabelas). Entretanto, como são pontos isolados e a independência dos resíduos foi assegurada pelo teste de Durbin-Watson (Eq. 1.6), esses níveis foram mantidos. Ainda, por meio da análise dos gráficos de resíduos, nenhuma tendência nos resultados foi constatada, podendo ser atribuída aleatoriedade aos mesmos. Portanto, com base nesses resultados, a linearidade foi atendida para todos os analitos nas amostras coletadas ao longo do rio Belém.

Para comparar as curvas em diferentes matrizes e verificar a influência dos componentes da matriz na resposta de cada analito, a sensibilidade, estimada pelo coeficiente angular da reta, de cada analito em cada situação foi comparada. Para compensar as interferências da matriz sob os analitos, as curvas analíticas foram construídas nas amostras para representar de forma mais real a determinação dos compostos de interesse. Nota-se que o coeficiente angular obtido é muitas vezes maior que o obtido para curva em solvente, devido a pré-concentração conferida pelo método otimizado. Comparando a sensibilidade obtida nas diversas amostras, sensibilidades similares dos analitos em todas as amostras foram observadas. Entretanto, foi possível observar, em menor grau de extensão, o efeito dos componentes presentes na matriz para cada analito. Por exemplo, a influência da

TABELA 2.12 - RESULTADOS DOS TESTES DE PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE E CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA PARA P1 (n = 3) PARA AMOSTRAS COLETADAS EM AGOSTO-2017

Analito	Equação da reta	R ²	FCL* (µg L ⁻¹)	Teste F**	Teste D-W***
				F _{calc}	d _{calc}
CAF	y = 2862 c _{CAF} - 174,9	0,9999	1,00 - 100	F _{1,2} =9,3; F _{2,3} =3,8; F _{3,4} =5,9; F _{4,5} =1,6; F _{5,6} =38,6; F _{6,7} =1,9	2,93
CBZ	y = 3988 c _{CBZ} + 5664	0,9999	1,00 - 100	F _{1,2} = 4,2; F _{2,3} = 11,0; F _{3,4} =2,0; F _{4,5} =19,6; F _{5,6} = 215,9 ; F _{6,7} =2,4	2,32
CRF	y = 2321 c _{CRF} + 2937	0,9965	5,00 - 100	F _{1,2} =4,5; F _{2,3} = 2998 ; F _{3,4} = 63,8 ; F _{4,5} =7,1	2,18
HCT	y = 5465 c _{HCT} - 196,1	0,9999	1,00 - 100	F _{1,2} =10,5; F _{2,3} =2,0; F _{3,4} =1,2; F _{4,5} =3,7; F _{5,6} =35,8; F _{6,7} =1,8	2,41
BFA	y = 1200 c _{BFA} - 307,7	0,9994	2,50 - 100	F _{1,2} =1,0; F _{2,3} =1,2; F _{3,4} =8,9; F _{4,5} =4,0; F _{5,6} =1,7	2,40
E2	y = 558,1 c _{E2} + 3019	0,9992	5,00 - 100	F _{1,2} =2,9; F _{2,3} =12,4; F _{3,4} =1,6; F _{4,5} =4,6	2,29
EE2	y = 489,5 c _{EE2} + 265,0	0,9995	5,00 - 100	F _{1,2} =1,5; F _{2,3} =1,1; F _{3,4} =5,2; F _{4,5} =12,5	2,19
SMX	y = 3793 c _{SMX} - 9567	0,9959	5,00 - 100	F _{1,2} =1,3; F _{2,3} = 123,4 ; F _{3,4} =2,6; F _{4,5} =1,7	1,90
DZP	y = 4671 c _{DZP} +11818	0,9992	5,00 - 100	F _{1,2} =4,5; F _{2,3} =2,6; F _{3,4} =2,0; F _{4,5} =3,0	1,88

*FCL: Faixa de concentração linear

Valor crítico F_{2,2,95%}=39,0 (bicaudal)*Teste D-W: teste Durbin-Watson; d_{crítico}: d_L=1,08; d_U=1,28, exceto para EE2 e SMX: d_L=0,95; d_U=1,23

TABELA 2.13 - RESULTADOS DOS TESTES DE PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE E CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA PARA P2 (n = 3) PARA AMOSTRAS COLETADAS EM AGOSTO-2017

Analito	Equação da reta	R ²	FCL* (µg L ⁻¹)	Teste F**	Teste D-W***
				F _{calc}	d _{calc}
CAF	y = 2987 c _{CAF} – 3114	0,9999	5,00 – 100	F _{1,2} =1,2; F _{2,3} =2,8; F _{3,4} =3,0; F _{4,5} =15,7	2,35
CBZ	y = 4044 c _{CBZ} + 4857	0,9999	2,50 – 100	F _{1,2} = 1,1; F _{2,3} = 2,6; F _{3,4} =7,3; F _{4,5} =6,2; F _{5,6} =3,0	2,09
CRF	y = 2414 c _{CRF} – 2277	0,9999	5,00 – 100	F _{1,2} =35,8; F _{2,3} = 97,4 ; F _{3,4} =21,4; F _{4,5} =2,3	2,39
HCT	y = 5558 c _{HCT} + 1237	0,9998	2,50 – 100	F _{1,2} =14,1; F _{2,3} =1,0; F _{3,4} =21,2; F _{4,5} = 72,7 ; F _{5,6} =3,0	2,21
BFA	y = 1216 c _{BFA} + 176,3	0,9999	2,50 – 100	F _{1,2} =4,2; F _{2,3} =5,4; F _{3,4} =13,4; F _{4,5} =32,5; F _{5,6} =4,4	1,99
E2	y = 530,2 c _{E2} + 1365	0,9992	2,50 – 100	F _{1,2} =1,4; F _{2,3} =8,7; F _{3,4} =1,9; F _{4,5} =4,9; F _{5,6} =1,6	1,80
EE2	y = 516,7 c _{EE2} – 952,4	0,9995	5,00 – 100	F _{1,2} = 432,2 ; F _{2,3} =16,2; F _{3,4} =31,9; F _{4,5} =4,5	2,14
SMX	y = 3165 c _{SMX} – 4789	0,9925	5,00 – 100	F _{1,2} =12,8; F _{2,3} =1,1; F _{3,4} =2,1; F _{4,5} =6,4	1,27
DZP	y = 4669 c _{DZP} +12625	0,9990	2,50 – 100	F _{1,2} =24,2; F _{2,3} =7,0; F _{3,4} =1,6; F _{4,5} =4,9; F _{5,6} =3,0	2,02

*FCL: Faixa de concentração linear

Valor crítico F_{2,2,95%}=39,0 (bicaudal)*Teste D-W: teste Durbin-Watson; d_{crítico}: d_L=1,08; d_U=1,28, exceto para CAF, CRF, EE2 e SMX: d_L=0,95; d_U=1,23

TABELA 2.14 - RESULTADOS DOS TESTES DE PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE E CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA PARA P3 (n = 3) PARA AMOSTRAS COLETADAS EM AGOSTO-2017

Analito	Equação da reta	R ²	FCL* (µg L ⁻¹)	Teste F**	Teste D-W***
				F _{calc}	d _{calc}
CAF	y = 2567 c _{CAF} + 833,6	0,9995	10,0 – 100	F _{1,2} =14,4; F _{2,3} =7,5; F _{3,4} =5,7; F _{4,5} = 291,2	2,77
CBZ	y = 4014 c _{CBZ} + 644,3	0,9992	2,50 – 100	F _{1,2} = 2,3; F _{2,3} = 7,2; F _{3,4} =1210; F _{4,5} = 690,0 ; F _{5,6} = 43,0 ; F _{6,7} =5,0	2,12
CRF	y = 2410 c _{CRF} – 2141	0,9998	5,00 – 100	F _{1,2} =7,4; F _{2,3} = 293,8 ; F _{3,4} = 194,9 ; F _{4,5} =6,9; F _{5,6} =5,2	2,70
HCT	y = 5355 c _{HCT} + 5589	0,9999	5,00 – 100	F _{1,2} =3,2; F _{2,3} =1,8; F _{3,4} =4,9; F _{4,5} =3,9; F _{5,6} =5,2	2,00
BFA	y = 1212 c _{BFA} + 281,7	0,9996	2,50 – 100	F _{1,2} =6,7; F _{2,3} =2,9; F _{3,4} =1,5; F _{4,5} =1,7; F _{5,6} =4,9; F _{6,7} =1,6	1,32
E2	y = 556,6 c _{E2} + 1121	0,9987	5,00 – 100	F _{1,2} =2,1; F _{2,3} =7,8; F _{3,4} =13,2; F _{4,5} =19,3; F _{5,6} =1,6	1,68
EE2	y = 533,1 c _{EE2} + 125,4	0,9997	10,0 – 100	F _{1,2} =2,3; F _{2,3} = 53,3 ; F _{3,4} =19,9; F _{4,5} =8,9	2,02
SMX	y = 4039 c _{SMX} + 7719	0,9989	10,0 – 100	F _{1,2} =1,2; F _{2,3} =3,8; F _{3,4} =9,5; F _{4,5} =1,8	1,94
DZP	y = 4850 c _{DZP} – 2509	0,9997	10,0 – 100	F _{1,2} =1,1; F _{2,3} =17,3; F _{3,4} =1,4; F _{4,5} =7,9	2,41

*FCL: Faixa de concentração linear

Valor crítico F_{2,2,95%}=39,0 (bicaudal)*Teste D-W: teste Durbin-Watson; d_{crítico}: d_L=1,08; d_U=1,28, exceto para CAF, EE2, SMX e DZP: d_L=0,95; d_U=1,23

matriz em P3 para CAF foi superior aos outros pontos avaliados, matriz em P3 para CAF foi superior aos outros pontos avaliados, apresentando menor sensibilidade para este analito (sensibilidades de 2567 em P3, 2987 em P2 e 2862 em P1). No caso da SMX, a menor sensibilidade foi obtida em P2. Apesar de um menor efeito ser esperado para P1, para alguns analitos, como CRF e EE2, apresentaram as menores sensibilidade nessa amostra, confirmando a necessidade de se construir curvas analíticas em cada um dos pontos amostrados.

2.3.3.4 LOD e LOQ

Os valores de LOD e LOQ obtidos para o método QuEChERS-LC-DAD são mostrados na Tabela 2.15.

TABELA 2.15 - LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO OBTIDOS PARA O MÉTODO QuEChERS-LC-DAD

Amostra		CAF	CRF	CBZ	HCT	BFA	E2	EE2	SMX	DZP
P1	LOD*	0,638	4,74	0,734	0,261	0,973	3,28	3,18	1,49	2,92
	LOQ*	1,00	5,00	1,00	1,00	2,50	5,00	5,00	5,00	5,00
P2	LOD*	2,85	1,49	0,981	2,15	0,677	1,48	2,76	3,79	2,22
	LOQ*	5,00	5,00	2,50	2,50	2,50	2,50	5,00	5,00	2,50
P3	LOD*	3,43	3,46	0,256	0,524	0,168	1,82	1,54	2,82	0,700
	LOQ*	10,0	5,00	2,50	5,00	2,50	5,00	10,0	10,0	10,0

* Valores de LOD e LOQ em $\mu\text{g L}^{-1}$

Os menores valores de LOQ, calculados pelo método visual, considerando a menor concentração obtida com exatidão e precisão, foram obtidos para amostra P1 (menores ou igual a $5,00 \mu\text{g L}^{-1}$), a qual pode ser considerada como uma matriz mais limpa, e, portanto, com uma menor influência antropogênica, uma vez que está localizada a 500 m da nascente do rio Belém. No outro extremo de complexidade de matriz, os LOQ aumentaram para a maioria dos compostos. Em relação aos LOD, calculados através dos parâmetros da curva analítica, apesar de alguns compostos serem detectados em baixas concentrações, como por exemplo, a HCT em P3 ($0,524 \mu\text{g L}^{-1}$), estes não puderam ser quantificados com precisão e exatidão adequados, especialmente para P3, mostrando a grande interferência da matriz

A CBZ pôde ser quantificada no mesmo nível de concentração inferior ($2,50 \mu\text{g L}^{-1}$) em todos os pontos analisados. Esse resultado sugere que os componentes da matriz têm influência similar sobre a CBZ em todas as amostras,

podendo ser selecionada como um traçador da atividade antropogênica, assim como a CAF. Este fármaco não ocorre naturalmente em águas superficiais e sua presença se deve ao lançamento de esgoto e efluentes de estação de tratamento de esgoto. Clara, Strenn e Kreuzinger (2004) relataram que a CBZ pode ser considerada como um parâmetro qualificado para detectar a presença de esgoto no ambiente aquático, pois experimentos sugeriram que a CBZ não fica retida, nem é removida nos sistemas convencionais de tratamento de esgoto. Ainda, testes com aplicação de água tratada em solo, mostraram a presença da CBZ em água subterrânea, sugerindo sua persistência no ambiente (CLARA; STRENN; KREUZINGER, 2004).

Os hormônios E2 e EE2 foram recentemente incluídos nas listas de compostos com necessidade de monitoramento prioritário das principais agências ambientais internacionais (USEPA e EU Water Framework Directive). Os limites de quantificação destes compostos para o método desenvolvido foram entre 2,5 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. Esses valores estão acima de valores encontrados na literatura para amostras de água, que está na faixa de décimos de ng L^{-1} (BARREIROS et al., 2016). Entretanto, a maioria dos trabalhos utiliza métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas, que possibilita a obtenção de melhores seletividade e detectabilidade para o método. A utilização do presente método de extração utilizando como detecção LC-MS pode ser um trabalho futuro para mostrar a potencialidade do QuEChERS nessa matriz.

A importância de se adequar um bom preparo de amostra à matriz de interesse fica evidenciada pelos LOQ atingidos quando comparados a outros trabalhos na literatura (Tabela 2.16).

TABELA 2.16 – COMPARAÇÃO DOS LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO PARA OS ANALITOS INVESTIGADOS OBTIDA EM DIFERENTES MÉTODOS

Analito	Método	LOQ / $\mu\text{g L}^{-1}$	FE	Referência
CAF	SPME-GCxGC-TOF	100	-	Gomes et al. (2013)
E2		2,1		
EE2		21		
CBZ	SPE-HPLC-DAD	10	10000x	Madureira et al. (2010)
DZP		40		
SMX		35		
BFA	SPE-LC-MS/MS	0,0012	5000x	Sodré et al. (2010)
CBZ CRF	SPE-LC-MS/MS	0,005	12,5	Stolker et al. (2004)

Por exemplo, Gomes et al. (2013) empregaram a microextração em fase sólida e cromatografia em fase gasosa multidimensional acoplada à espectrometria de massas por tempo de voo para determinação de CAF, E2 e EE2 (além de outros analitos) em amostras de água com LOQ de 100, 2,1 e 21 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (GOMES et al., 2013). O método proposto no presente trabalho é mais sensível para a cafeína (10 $\mu\text{g L}^{-1}$) empregando um método de detecção menos sofisticado.

Em outro caso, Madureira et al. (2010) aplicaram um método SPE-HPLC-DAD para determinação de fármacos em águas estuárias com LOQ de 15, 40 e 35 $\mu\text{g L}^{-1}$ para CBZ, DZP e SMX, respectivamente, considerando uma pré-concentração de dez mil vezes (MADUREIRA et al., 2010). Considerando que os LOQ foram obtidos direto na matriz e são mais realistas da concentração a ser determinada, o método proposto no presente trabalho pode ser considerado compatível ou superior com alguns trabalhos na literatura, sem a necessidade de grandes fatores de pré-concentração.

Por outro lado, métodos empregando extração em fase sólida para pré-concentração dos analitos e sistemas LC-MS/MS atingem, geralmente, limites na ordem de ng L^{-1} . Sodré et al. (2010) detectaram BFA em águas superficiais da região de São Paulo empregando LC-MS/MS com LOQ de 1,2 ng L^{-1} (SODRÉ et al., 2010). Stolker et al. (2004) utilizaram LC-MS/MS para análise de fármacos em água superficial, de abastecimento e subterrânea, no qual CBZ e CRF apresentaram 5 ng L^{-1} como LOQ (STOLKER et al., 2004). Como mencionado anteriormente, visto a potencialidade de sistemas hifenados como o anterior, a aplicação do método QuEChERS otimizado no presente trabalho associado com a técnica LC-MS/MS pode ser um trabalho futuro para mostrar a potencialidade do método nessa matriz.

2.3.3.5 Exatidão

O estudo de recuperação foi realizado em três níveis diferentes de fortificação (próximos ao 20, 30 e 40 $\mu\text{g L}^{-1}$, exceto SMX, 30, 40 e 60 $\mu\text{g L}^{-1}$, $n=6$) mostrados na Tabela 2.16. Os critérios de aceitação admitidos pela Diretiva da Comunidade Europeia para o estudo de recuperação dos analitos são bastante rígidos, sendo considerados adequados quando os valores estão dentro de $\pm 10\%$ do valor alvo (concentração de fortificação). Com base nisso, a maioria dos analitos apresentou recuperações dentro dessa faixa aceitável.

Entretanto, para alguns analitos, valores fora da faixa aceita por esta norma foram observados, como é o caso da CAF, E2 e SMX. Tal fato pode estar relacionado com a elevada complexidade da matriz analisada, sendo difícil de mensurar a quantidade de compostos presentes nessas amostras, os quais podem suprimir ou aumentar o sinal cromatográfico. Entretanto, segundo González, Herrador e Asuero (2010) baseados em levantamentos estatísticos, valores de 60 a 115% são aceitáveis para a faixa de concentração estudada (GONZÁLEZ; HERRADOR; ASUERO, 2010).

Esses valores podem ser ainda alterados se forem levados em consideração a matriz de análise. Para a nascente, por exemplo, é esperado um menor efeito de matriz sobre a recuperação já que essa amostra de água não sofreu tanta influência antropogênica. Pelo contrário, a amostra coletada no bairro Boqueirão, sofre a influência de despejo de esgoto clandestino durante todo o percurso do rio. Com isso, as recuperações mais baixas obtidas para SMX foram consideradas adequadas desde que o método foi considerado seletivo e a dispersão dos dados de recuperação foi baixa (<24%).

TABELA 2.17 - RESULTADOS PARA RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS EMPREGANDO O MÉTODO QuEChERS-LC-DAD (n=6) PARA AMOSTRAS DE ÁGUA COLETADAS EM NOVEMBRO-2016

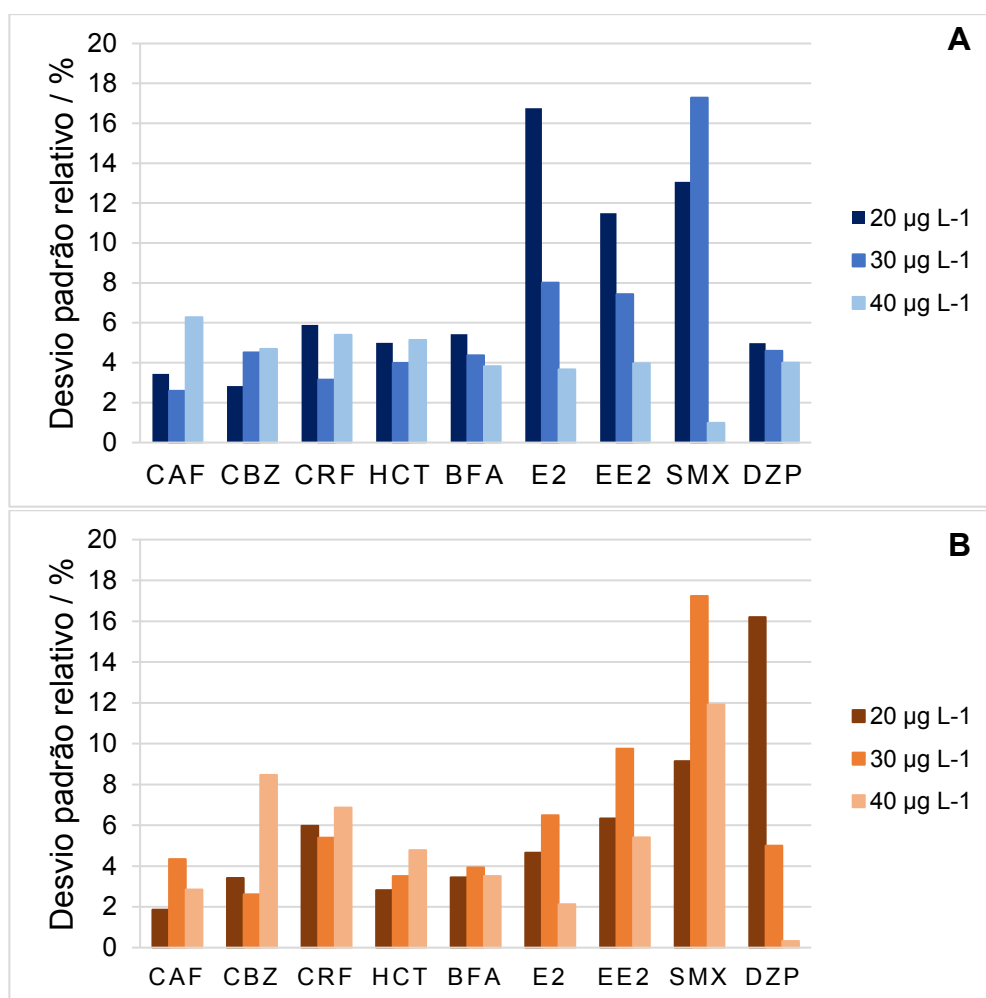
Amostra	Nível	Recuperação / %								
		CAF	CBZ	CRF	HCT	BFA	E2	EE2	SMX*	DZP
P1	20 µg L ⁻¹	118±4	103±3	106±6	118±6	110±6	67±11	97±11	136±18	94,0±5
	30 µg L ⁻¹	118±3	104±5	115±4	111±4	112±5	81±6	113±6	132±22	102±5
	40 µg L ⁻¹	91±7	98±5	119±7	110±6	107±4	91±3	119±5	134±1	103±5
P2	20 µg L ⁻¹	91±2	101±3	118±7	116±3	109±4	94±4	121±8	88±8	101±16
	30 µg L ⁻¹	102±4	97±2	113±5	112±4	103±34	94±6	114±11	140±24	94±5
	40 µg L ⁻¹	111±3	103±9	108±7	115±5	106±4	100±2	125±7	129±15	100±0,3
P3	20 µg L ⁻¹	123±5	94±3	98±2	112±0,8	103±2	71±1	93±3	65±9	94±4
	30 µg L ⁻¹	123±14	97±4	109±5	116±4	106±5	81±6	104±4	71±17	98±5
	40 µg L ⁻¹	123±13	94±5	111±3	114±5	103±4	87±1	106±5	78±9	97±4

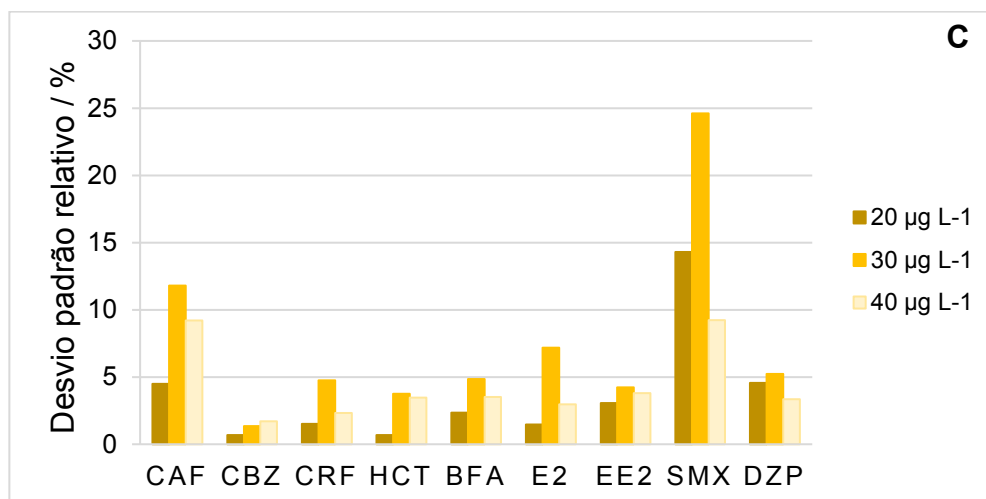
*exceto SMX 30, 40 e 60 µg L⁻¹

2.3.3.6 Precisão

A precisão foi avaliada através da repetibilidade em sextuplicatas em três níveis de concentração (idem ao ensaio de recuperação) e através da precisão intermediária. Valores inferiores a 20% foram observados para a maioria dos analitos nas diferentes matrizes estudadas, resultados que se enquadram nos critérios de aceitação da Diretiva da Comunidade Europeia para a faixa de concentração estudada. Os resultados de repetibilidade para todas as amostras são apresentados na Figura 2.10. A exceção ocorreu para SMX que apresentou coeficientes de variação de 24,62% para a matriz P3.

FIGURA 2.10 – DESVIOS PADRÃO RELATIVO (RSD%) PARA DIFERENTES NÍVEIS DE FORTIFICAÇÃO (n=6) PARA CADA COMPOSTO PARA O ENSAIO DE REPETIBILIDADE DE A) P1 B) P2 E C) P3 COLETADAS EM NOVEMBRO-2016.





Geralmente, é esperado que o método avaliado segundo a repetibilidade seja preciso, já que possíveis variações como, por exemplo, mudança de temperatura, dia de análise e/ou operador, não são incluídas durante a realização do experimento.

Em relação a precisão intermediária realizou-se a comparação entre os resultados obtidos em diferentes coletas (Tabela 2.17).

TABELA 2.18 - PRECISÃO INTERMEDIÁRIA DOS ANALITOS EMPREGANDO O MÉTODO QuEChERS-LC-DAD (n=12) PARA AMOSTRAS EM DIFERENTES COLETAS

Amostra	Nível	Desvio padrão relativo / %								
		CAF	CRF	CBZ	HCT	BFA	E2	EE2	SMX*	DZP
P1	20 µg L ⁻¹	5,7	8,0	7,8	7,0	5,6	12,3	8,2	21,2	11,4
	30 µg L ⁻¹	14,3	12,9	12,5	14,2	10,0	16,2	14,7	13,5	8,5
	40 µg L ⁻¹	14,5	21,1	14,6	10,4	14,8	19,6	15,9	11,3	20,6
P2	20 µg L ⁻¹	5,7	6,5	6,7	5,2	4,3	6,8	7,6	11,3	5,4
	30 µg L ⁻¹	5,4	4,6	4,4	3,7	3,5	5,7	7,4	13,7	5,1
	40 µg L ⁻¹	5,6	7,4	7,1	6,9	6,6	8,5	7,2	14,1	7,0
P3	20 µg L ⁻¹	6,4	7,4	11,4	8,0	10,9	20,1	11,4	17,3	9,5
	30 µg L ⁻¹	12,2	11,0	14,0	13,4	12,9	18,7	15,1	18,6	12,9
	40 µg L ⁻¹	7,9	8,8	7,5	5,1	5,7	7,6	10,0	15,2	4,7

*exceto SMX 30, 40 e 60 µg L⁻¹

Valores abaixo ou muito próximo de 20% (no caso de E2 em P3 e DZP em P1) foram obtidos. Isso reflete que o método validado é preciso quanto a sua aplicação em diversas coletas. Ainda, pode-se inferir que os valores de repetibilidade superiores a 20% devem ser referentes a algum interferente na coleta realizada em novembro de 2016 (primavera).

2.3.3.7 Robustez

A robustez do método QuEChERS-LC-DAD para quantificação dos nove poluentes orgânicos foi avaliada por meio do teste de Youden. As variáveis investigadas compreenderam tanto fatores que poderiam influenciar o método cromatográfico (proporção inicial da fase móvel) quanto o método de preparo de amostra (quantidades de NaCl, MgSO₄, PSA e C18, tempo de centrifugação e temperatura de secagem da amostra).

Em relação ao efeito dos fatores, as pequenas alterações na quantidade de NaCl, MgSO₄ e PSA foram as que mais influenciaram no sistema. Como esses fatores são os mesmos otimizados no planejamento CCD, essa evidência mostra, mais uma vez, a importância de se otimizar adequadamente os fatores envolvidos na extração e mantê-los nos níveis adequados para garantir a robustez do método.

Para os analitos CAF e CRF, nenhum dos fatores avaliados no teste de Youden influenciou significativamente as respostas em termos de recuperação dos mesmos.

A variação da fase móvel inicial foi significativa para E2 (efeito positivo). Entretanto, as recuperações obtidas nos ensaios de robustez estavam entre 93,7 e 117% com RSD inferior a 9,9%. O efeito da temperatura de secagem foi significativo para BFA e DZP (ambos positivos). Entretanto, assim como para o efeito da fase móvel, as recuperações se encontravam na faixa adequada, tendo menor relevância na robustez do método.

Os fatores com menor influência para a maioria dos analitos foram a quantidade de C18 e o tempo de centrifugação.

Com base nos resultados da validação, o método desenvolvido foi considerado adequado em termos dos parâmetros avaliados (seletividade, precisão, exatidão, linearidade e robustez), garantindo a validade dos resultados quanto a sua aplicação na quantificação desses analitos em amostras de água superficial.

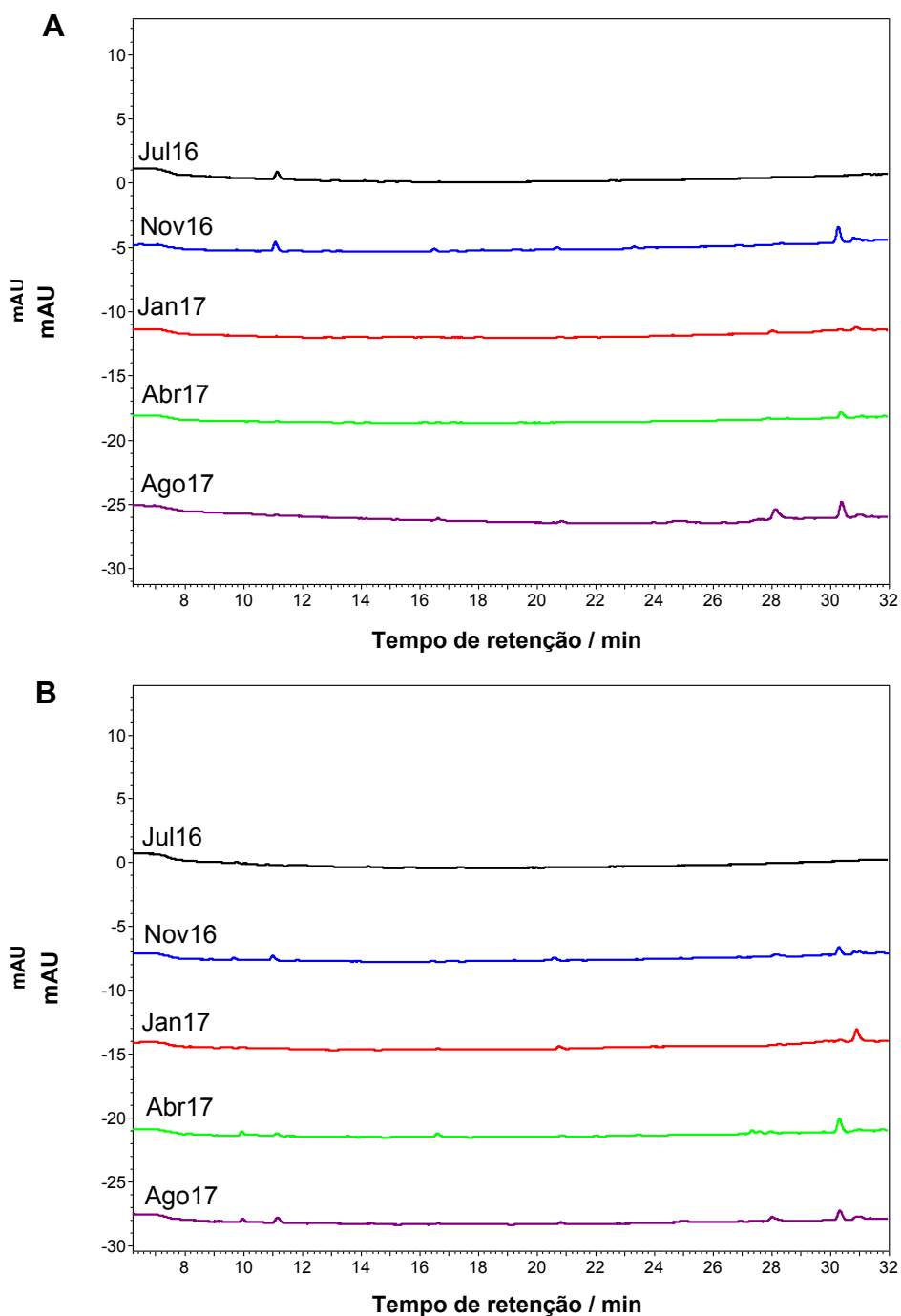
2.3.4 Aplicação do método

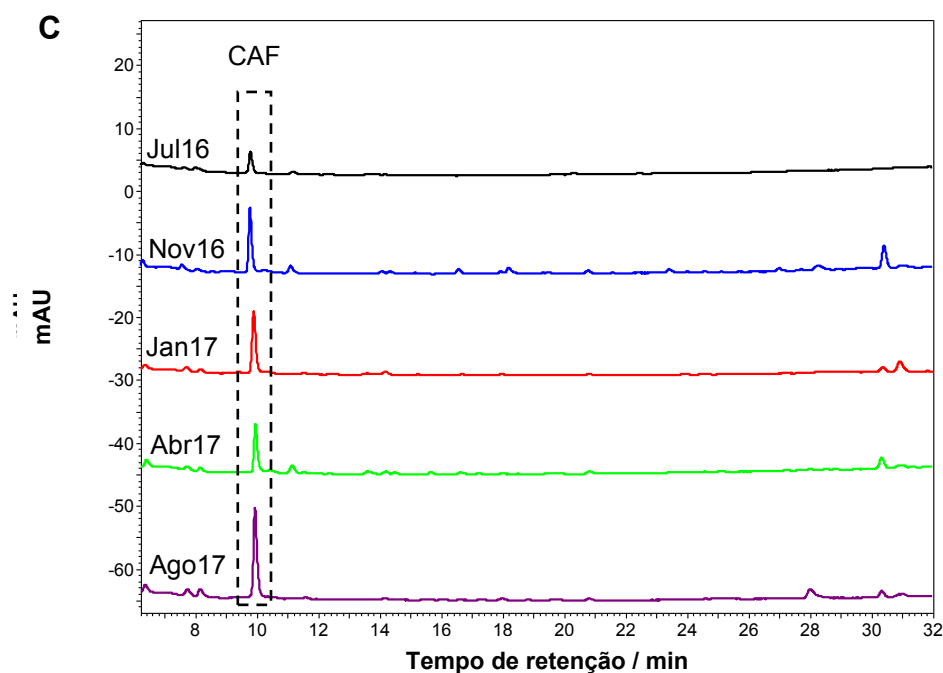
Após o desenvolvimento e validação do método analítico para determinação de fármacos, hormônios e BFA em água de rio empregando QuEChERS-LC-DAD, o mesmo foi empregado para a avaliação da presença de tais substâncias em cinco

amostragens realizadas no rio Belém entre julho de 2016 e agosto de 2017, compreendendo as quatro estações do ano.

Os cromatogramas obtidos para as amostras coletadas no período de investigação estão mostrados na Figura 2.11.

FIGURA 2.11 - CROMATOGRAMAS EM 280 nm OBTIDOS PARA ANÁLISE EMPREGANDO O MÉTODO QuEChERS-LC-DAD DAS CINCO CAMPANHAS AMOSTRAIS REALIZADAS EM A) P1, B) P2 E C) P3





O único analito encontrado no período amostrado foi a cafeína, a qual estava presente em níveis quantificáveis em todas as amostragens de P3 e no inverno em P2. Os cromatogramas obtidos nas diferentes campanhas amostrais mostram ainda a presença de compostos não-alvo, os quais eluíram em tempos de retenção diferentes dos analitos. Como o sistema de detecção adotado necessita de padrões dos analitos alvo, não foi possível identificar tais compostos.

Os resultados obtidos a partir das campanhas amostrais realizadas ao longo de um ano são mostrados na Tabela 2.18.

TABELA 2.19 - CONCENTRAÇÃO DE CAFEÍNA ($\mu\text{g L}^{-1}$) DETERMINADA NAS CINCO CAMPANHAS AMOSTRAIS NO RIO BELÉM

Pontos amostrados	Concentração CAF / $\mu\text{g L}^{-1}$				
	1 ^a Campanha Jul-2016	2 ^a Campanha Nov-2016	3 ^a Campanha Jan-2017	4 ^a Campanha Abr-2017	5 ^a Campanha Ago-2017
P1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
P2	6,08±0,55	n.d.	n.d.	< LOQ	< LOQ
P3	84,2±6,0	47,2±1,8	58,5±1,7	40,6±0,8	95,2±2,8

n.d.: não detectado;

As concentrações mais altas de cafeína foram detectadas no período mais seco e frio do ano (julho e agosto), verificadas na primeira e última campanha. Geralmente, essas maiores concentrações estão atreladas a uma menor diluição da

amostra pelo baixo índice pluviométrico (INMET, 2018). Como mencionado anteriormente, o rio Belém recebe grande aporte de esgoto doméstico. Bollman e Edwiges (2008) aplicaram o índice de qualidade das águas (IQA) para o rio Belém e constataram que a qualidade das águas apresenta piora progressiva ao longo do rio em direção à sua foz, na qual a água foi classificada pelos autores como imprópria para qualquer tipo de uso. Ainda, de acordo com os dados do último relatório para o monitoramento da qualidade das águas da Bacia do Alto Iguaçu do Instituto Ambiental do Paraná (IAP), a classificação do rio Belém a montante do Parque São Lourenço tem se mantido como poluído (Classe 4) desde 1992, enquanto que o ponto monitorado mais próximo da foz, é classificado como extremamente poluído, estando fora do enquadramento da CONAMA, inclusive para rios de Classe 4 (IAP, 2009). Os baixos níveis de oxigênio dissolvido monitorados além de fósforo total, nitrogênio amoniacal e DBO em níveis elevados (IAP, 2009), associados às elevadas concentrações de cafeína em P3 encontradas no presente trabalho, sugerem a contribuição antropogênica nesse rio, provavelmente associadas as condições inadequadas de saneamento.

De acordo com a primeira pesquisa no âmbito nacional sobre a presença de CEC em águas destinadas para o abastecimento e consumo humano (MACHADO et al., 2016), a cafeína foi o composto mais frequentemente detectado (93%) em amostras de água coletadas nas capitais brasileiras. Particularmente em Curitiba, apenas 51% da população da capital e 41% na Região Metropolitana têm disponível em seu domicílio a rede coletora de esgoto (CANELA et al., 2014).

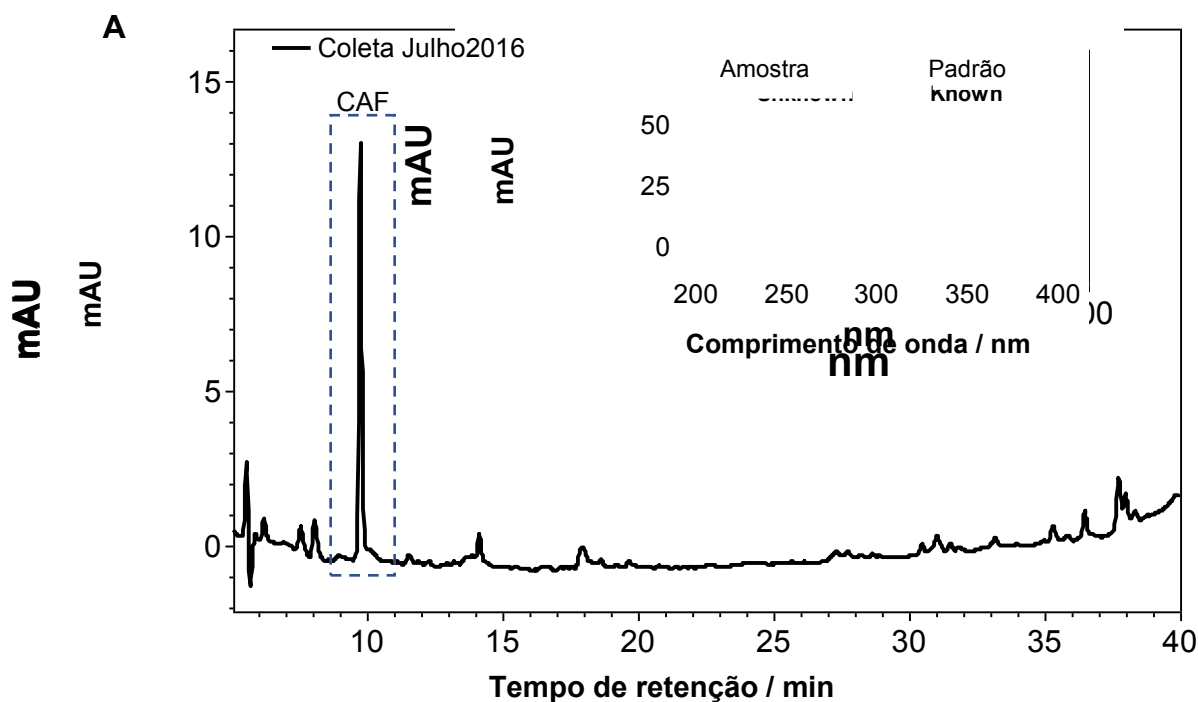
Froehner et al. (2011) também detectaram cafeína em todas as amostras coletadas na bacia do Alto Iguaçu na região de Curitiba em 2009. As concentrações variaram na faixa de 1,74 a 123,4 $\mu\text{g L}^{-1}$. Huerta-Fontela et al. (2008) encontraram cafeína em amostras de afluente de estação de tratamento de esgoto (ETE) na Espanha com concentrações de até 209 $\mu\text{g L}^{-1}$. A CAF foi detectada por esses autores em 95% das amostras coletadas. Na região da Catalunha, Pedrouzo et al. (2011) determinaram CAF entre 0,950 e 9,94 $\mu\text{g L}^{-1}$ também em afluentes de ETE entre 2007 e 2008. Agunbiade e Moodley (2014) determinaram CAF em amostras de afluente de ETE em KwaZulu-Natal, África do Sul, encontrando concentrações da ordem de 61 $\mu\text{g L}^{-1}$.

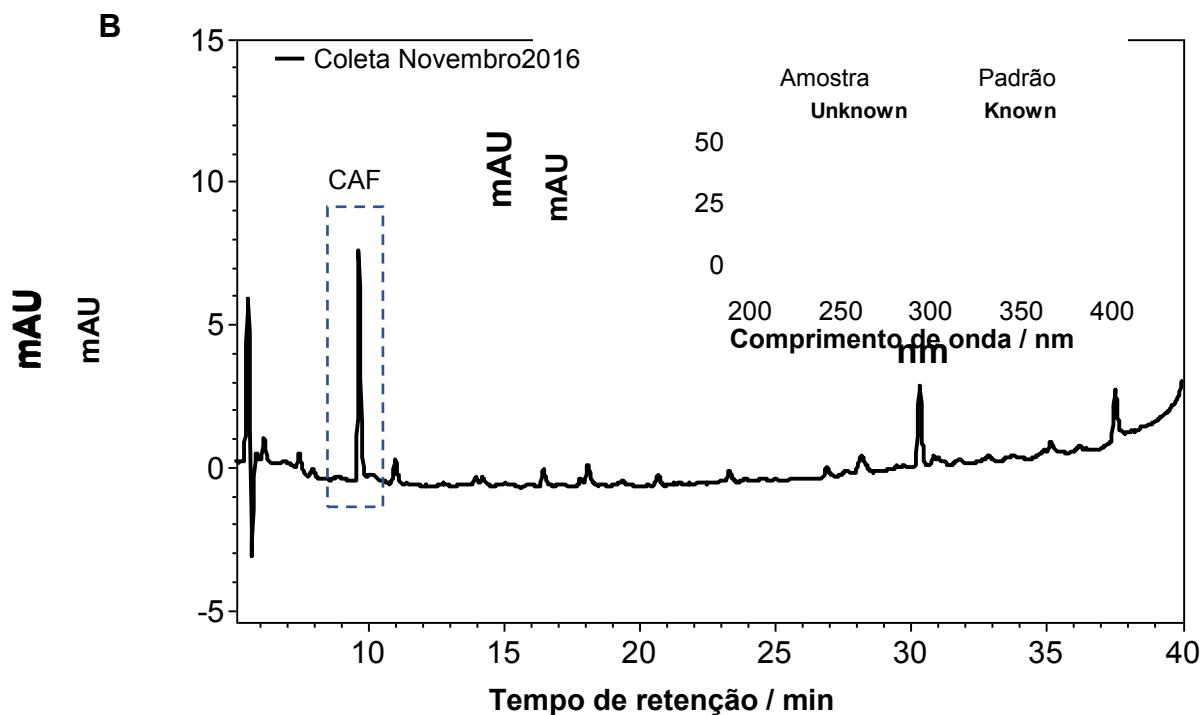
Todos estes antecedentes da literatura mostram a presença ubíqua desse composto em águas superficiais e de afluentes de ETE, confirmando que a variação

na concentração da CAF, não depende somente da sazonalidade, mas também da taxa de consumo de alimentos contendo CAF bem como do sistema de coleta e tratamento de esgoto doméstico. Outro detalhe importante é que as concentrações encontradas no presente trabalho têm maior similaridade com aquelas encontradas em amostras de ETE, mostrando mais uma vez a grande poluição vinculada ao lançamento de esgoto doméstico no rio Belém.

Para a confirmação da quantificação desse analito empregando o DAD, pode ser realizada a comparação de um espectro registrado em um determinado tempo de retenção com o espectro padrão da substância armazenado previamente na biblioteca do software. Dessa forma, a porcentagem de similaridade para a CAF foi de 99,11 a 99,93% para as amostras de P3. Com base nessa informação, é possível afirmar que a substância determinada nas amostras é a cafeína, como pode ser visualizado no gráfico inserido na Figura 2.12.

FIGURA 2.12 - CROMATOGRAMAS EM 280 nm OBTIDOS PARA ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS EM P3 EMPREGANDO O MÉTODO QuEChERS-LC-DAD EM A) JULHO/2016 E B) NOVEMBRO/2016. GRÁFICO INSERIDO: COMPARAÇÃO DO ESPECTRO OBTIDO PARA CAFEÍNA NA AMOSTRA E NO PADRÃO.





A variação da concentração de CAF encontrada ao longo do ano, pode ser atribuída a prováveis diferenças na vazão do rio em detrimento ao período de maior e menor pluviosidade. No caso da amostra coletada no inverno de 2016, por exemplo, o valor de chuva acumulada nos cinco dias anteriores a coleta foi de 0 mm (INMET, 2016), podendo levar ao acúmulo deste analito na água superficial, levando a maiores valores de CAF para esta amostragem. Para a amostra de novembro de 2016, período chuvoso antecedeu a coleta, tendo dias com precipitação superior a 60 mm (INMET, 2016), podendo ocasionar na diluição da quantidade de CAF ao longo do rio, apresentando um dos menores valores de concentração determinada de CAF. Além disso, o tempo de meia vida da CAF em sistemas aquáticos, calculado por Bradley et al. (2007), mostra uma certa variação dependendo o sistema considerado, de 5,3 a 23 dias. O tempo de meia vida relativamente pequeno sugere que a presença de cafeína nas amostras de água é reflexo de contaminação recente.

2.4 CONCLUSÕES

A determinação dos compostos da classe dos fármacos, hormônios e bisfenol A em amostras de água do Rio Belém foi conseguida com sucesso através da adaptação do método QuEChERS em associação com a LC-DAD. A principal

modificação realizada foi a redução do volume de acetonitrila (de 5,0 para 2,5 mL) utilizada para a extração dos analitos e a diminuição do volume de redissolução (de 1,0 mL para 250 μ L), agregando ao método um fator de concentração, necessário quando se utiliza detecção por DAD.

As principais variáveis que influenciaram no sistema QuEChERS, otimizadas via planejamento fatorial, foram as quantidades de MgSO_4 , NaCl e PSA. O método desenvolvido foi validado segundo recomendação da Diretiva da Comunidade Europeia, sendo o método considerado linear dentro da faixa de concentração estudada para cada analito, seletivo, com precisão e exatidão adequadas para a maioria dos analitos. Ainda, os limites de detecção e quantificação foram compatíveis com a concentração dos compostos esperada nas amostras reais.

O método validado aplicado em amostras reais coletados ao longo de um ano mostrou que a CAF foi encontrada em todas as estações do ano no ponto que sofre mais influência antrópica (P1), confirmando sua utilização como traçador de lançamento de esgoto no rio Belém. A maior concentração de CAF quantificada foi 95,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ em agosto/2017 (inverno).

O método desenvolvido é bastante simples e rápido para a determinação de contaminantes de preocupação emergente em água superficial, empregando quantidades mínimas de amostra e solvente. Além disso, resultados com exatidão, precisão e robustez adequados foram conseguidos mesmo na ausência de grandes fatores de concentração como em outras técnicas usualmente empregadas na análise ambiental. O método pode ser usado pra provimento de uma legislação mais adequada em termos das concentrações de CAF e demais analitos encontrados neste tipo de matriz sem a necessidade de equipamentos de alta complexidade instrumental e custo como LC e GC-MS/MS.

Os dados aqui apresentados corroboram ainda com o panorama nacional quanto a presença de compostos xenobióticos em águas superficiais. Entretanto, um estudo dos reais riscos quanto a exposição crônica a estes compostos bem como melhores alternativas para o tratamento de água e esgoto ainda se fazem necessários.

CAPÍTULO 3 : DETERMINAÇÃO MULTIRESÍDUO DE AGROTÓXICOS EM SOLO EMPREGANDO QuEChERS MODIFICADO E LC-DAD/FLD

3.1 INTRODUÇÃO

A aplicação de substâncias químicas orgânicas ou inorgânicas na agricultura desde a antiguidade clássica sempre esteve atrelada a garantia do fornecimento de produtos alimentícios para a população.

Segundo a USEPA, os agrotóxicos podem ser definidos como “qualquer substância ou mistura de substâncias destinadas para prevenir, destruir, repelir ou mitigar qualquer praga” (USEPA, 2011). Inúmeras são as classes de agrotóxicos (herbicidas, fungicidas, inseticidas, entre outros), aplicados com a finalidade de diminuir as perdas na produção agrícola, prevenindo e controlando espécies indesejáveis na agricultura, usualmente interferindo no seu processo reprodutivo.

O Brasil, com grande disponibilidade de território e clima ideal para muitas culturas, é um dos maiores consumidores de agrotóxicos no mundo. Em 2015, o Brasil alcançou a marca de 887,6 mil toneladas de agrotóxicos comercializados segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDIVEG), sendo o segundo maior mercado do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos (MENTEN, 2018). No Estado do Paraná, 83,0% da extensão territorial é ocupada pelas atividades agrícolas (IPARDES, 2017). A aplicação de agrotóxicos tem crescido nos últimos anos no Estado e a quantidade média aplicada em 2015 foi de 8,25 kg/ha/ano, o que totaliza mais de 100 milhões kg L⁻¹ (IPARDES, 2017). A situação pode ser ainda mais crítica se for levado em consideração os agrotóxicos não autorizados e aqueles comercializados ilegalmente.

A contaminação de vários estratos ambientais devido à permanência dos resíduos de agrotóxicos, é inerente ao manejo indevido e à aplicação dos agrotóxicos em larga escala para controle de pragas em diversas culturas. Uma vez aplicados no solo e/ou plantações, os agrotóxicos sofrem diversas transformações físicas e químicas, podendo ser volatilizados e transportados para a atmosfera; adsorvidos, interagindo com os diversos componentes do solo permanecendo retidos; escoados superficialmente e lixiviados, contaminando o ambiente aquático; e ainda sofrer

degradação e decomposição (BARCELÓ; HENNION, 1997; OLIVEIRA; REGITANO, 2009). Estima-se que menos de 0,1% do agrotóxico aplicado atinja realmente o alvo (PIMENTEL; LEVITAN, 1986).

O solo, por sua vez, é a camada da superfície terrestre em contato direto com a atmosfera, constituído por componentes sólidos, líquidos e gasosos de natureza mineral e orgânica, sobre o qual se desenvolve boa parte da biosfera do planeta (USDA, 2017). O solo pode ser considerado ainda como um sistema aberto, em equilíbrio dinâmico com a hidrosfera, trifásico, pois admite a presença de gases e água em contato direto com as partículas sólidas do solo e, multicomponente devido a presença de inúmeras substâncias (OLIVEIRA; REGITANO, 2009).

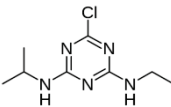
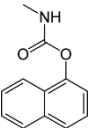
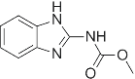
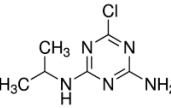
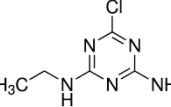
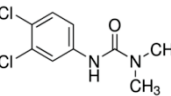
A poluição do solo devido à presença deste tipo de contaminante em níveis que afetam a qualidade ecológica e saúde humana representa um elevado risco. Muitos trabalhos comprovam a infeliz realidade da presença de agrotóxicos e seus metabólitos em solo (BOUAID et al., 2001; FERNANDES et al., 2013; KACZYŃSKI et al., 2016; LI et al., 2013; MIN et al., 2008). O impacto do uso contínuo de agrotóxicos pode atingir inclusive águas subterrâneas (ARIAS-ESTÉVEZ et al., 2008; JURADO et al., 2012; STUART et al., 2012).

3.1.1 Agrotóxicos selecionados para o estudo

Dentre os agrotóxicos de ampla aplicação, optou-se pelo desenvolvimento de um método para determinar resíduos de representantes de diferentes classes como os herbicidas atrazina e seus metabólitos, desetilatrazina e desisopropilatrazina, e diuron, o fungicida carbendazim e o inseticida carbaril. Todos os agrotóxicos estudados podem atuar, em diferentes extensões, na desregulação do sistema endócrino (MNIF et al., 2011).

A atrazina (ATZ, 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina) é o principal representante da classe dos herbicidas triazínicos, aplicados para o controle pré e pós-emergente de ervas daninhas em culturas como milho, abacaxi e cana-de-açúcar (ANVISA, 2018a; PENG et al., 2007). Os principais produtos de degradação, a desetilatrazina (DEA) e desisopropilatrazina (DIA), gerados por um processo de dealquilação microbiológica, possuem toxicidade similar a ATZ (SHIPITALO; OWENS, 2003). A atrazina, devido ao uso intenso e suas propriedades físico-químicas (Tabela 3.1), é comumente detectada no monitoramento de solos e águas subterrâneas.

TABELA 3.1 - ESTRUTURA MOLECULAR E PROPRIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DOS AGROTÓXICOS SELECIONADOS

Agrotóxico / Classe	Estrutura	MM / g mol ⁻¹	Solubilidade*/ mg L ⁻¹	pKa	log K _{ow}	K _{oc} / mL g ⁻¹	t _{1/2} solo/ dias
Atrazina C ₈ H ₁₄ ClN ₅ Herbicida (triazina)		215,68	35	1,70	2,70	165 [#]	60 [#]
Carbaril C ₁₂ H ₁₁ NO ₂ Inseticida (carbamato)		201,22	9,1	10,4	2,36	211	14 [‡]
Carbendazim C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ Fungicida (benzimidazol)		191,19	8,0	4,2	1,48	225	180 [†]
Desetilatrazina C ₆ H ₁₀ ClN ₅ (metabólito ATZ)		187,63	2700	n.d ^{**}	1,51	n.d	n.d
Desisopropilatrazina C ₅ H ₈ ClN ₅ (metabólito ATZ)		173,60	980	n.d	1,15	n.d	n.d
Diuron C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O Herbicida (uréia)		223,09	35,6	n.d	2,87	480 [#]	90 [#]

*Solubilidade a 20 °C; **não disponível; [#]OLIVEIRA E REGITANO, 2009; [‡]BARCELÓ E HENNION, 1997; [†]SINGH et al. (2016)

FONTE: (LEWIS et al., 2016)

O diuron (DIU, 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia) é um herbicida da classe das feniluréias que apresenta amplo espectro de ação, podendo ser aplicado no controle pré e pós-emergente de plantas infestantes em culturas de abacaxi, cana-de-açúcar, soja entre outras (ANVISA, 2018b). O DIU ainda pode ser empregado com a finalidade não-agrícola como aplicação em ferrovias, rodovias e agente anti-incrustação em tintas (GIACOMAZZI; COCHET, 2004). As características do DIU são muito similares a da ATZ, embora o coeficiente de sorção seja o maior observado para todos os agrotóxicos estudados. Isso indica que o DIU possui maior tendência de ser adsorvido devido a maior afinidade com as partículas do solo (GIACOMAZZI; COCHET, 2004).

Entre os principais agrotóxicos da classe dos carbamatos, o carbaril (CBL, 1-naftil-metilcarbamato) é um inseticida de amplo espectro, extensamente aplicado no cultivo de algodão, frutas, vegetais, grãos e em pastagens (ANVISA, 2018c). Os carbamatos, considerados agrotóxicos modernos, foram introduzidos em substituição aos organoclorados e rapidamente difundidos devido ao baixo custo e tempo de meia-vida relativamente curto (MORAIS; BEGNINI; JARDIM, 2013; SANTALADCHAIYAKIT; SRIJARANAI; BURAKHAM, 2012).

O carbendazim (CBD, metil-2-benzimidazol-carbamato) é um dos fungicidas do grupo benzimidazol mais empregados para o controle pré e pós-emergente nas culturas como trigo, soja, milho e feijão (ANVISA, 2018d). Ele também pode ser encontrado como um produto da degradação dos fungicidas benomil e tiofanato metílico (SINGH et al., 2016). Devido sua degradação lenta, o CBD persiste em solo por longos períodos de tempo.

Os mecanismos de interação entre os compostos xenobióticos e o solo são bastante complexos. A dinâmica dos agrotóxicos no solo depende não somente das propriedades físicoquímicas dos compostos (solubilidade em água, tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), pKa e coeficiente de sorção – K_{oc}), mas também das características de cada tipo de solo, como por exemplo, a quantidade de matéria orgânica humificada e a fração argilosa, os quais correspondem aos maiores sítios de atividade no solo (BARCELÓ, HENNION, 1997; OLIVEIRA, REGITANO, 2009). Entre os mecanismos geralmente envolvidos, usualmente de forma concomitante, interações do tipo ligações de hidrogênio, ligação covalente, atração eletrostática e forças de van der Waals podem estar presentes.

A partir das características relacionadas aos agrotóxicos selecionados apresentadas na Tabela 3.1, espera-se que CBD e DIU sejam mais persistentes no solo, devido sua menor solubilidade e maior K_{oc} , respectivamente, interagindo em maior extensão com a matéria orgânica, o que diminui sua mobilidade no solo. Já para ATZ e CBL, características intermediárias são esperadas. Os metabólitos da ATZ, por sua vez, altamente solúveis e com os menores coeficiente de partição octanol-água, devem possuir a maior mobilidade na fração aquosa dos solos (SHIPITALO; OWENS, 2003).

3.1.2 Determinação dos agrotóxicos selecionados em solo empregando QuEChERS

Existem diferentes métodos relatados na literatura para a determinação dos agrotóxicos em solo empregando extração líquido-líquido (WANG et al., 2008), assistida por ultrassom (TADEO et al., 2010), acelerada por solvente (WANG et al., 2007), micro-ondas (MERDASSA; LIU; MEGERSA, 2013), extração em fase sólida (RIGI; FARAHBAKHS; REZAEI, 2015), dispersão da matriz em fase sólida (ŁOZOWICKA et al., 2012), entre outros (ANDREU; PICÓ, 2004). Entretanto, algumas desvantagens, como procedimentos laboriosos e com alto consumo de solvente, levaram a uma ampla aplicação do método QuEChERS para extração de diversas classes de agrotóxicos em solo, com menor geração de resíduos tóxicos e detecção em menores níveis de concentração, principalmente quando se empregam técnicas cromatográficas associadas à espectrometria de massas.

Lesueur et al. (2008) apontaram o método QuEChERS com o mais indicado na extração de 24 agrotóxicos de solo quando comparado com extração por ultrassom e acelerada por solvente, entre outros. Os analitos foram determinados tanto por GC-MS quanto LC-MS/MS e o método QuEChERS original foi empregado. Os limites de quantificação para ATZ, DIA, DEA, CBD e DIU obtidos foram 43, 38, 43, 0,08 e 39 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente, sendo os maiores em comparação com as demais estratégias de preparo de amostra investigadas pelos autores.

Homazava et al. (2014) também compararam o QuEChERS com extração por líquido pressurizado (PLE) na extração multiclasse de 24 agrotóxicos de solo, dentre eles a ATZ e seus metabólitos e diuron. O preparo de amostra foi realizado usando 5 g de solo e 10 mL de ACN, 4 g MgSO_4 , 1 g NaCl e sais de citrato para partição, além de modificar a etapa de *clean-up*, utilizando C18, uma vez que a PSA apresentou

elevada interação com os analitos ácidos. Com a análise realizada por UHPLC-MS/MS, os limites de quantificação para esses analitos foi inferior a $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ e as recuperações entre 87,4 e 100,1%. O método foi aplicado para a determinação de amostras de solo real após a aplicação dos agrotóxicos. Após 60 dias da aplicação, a ATZ e seus metabólitos, DEA e DIA, estavam presentes nas concentrações de 13, 13 e $9,6 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Em trabalho similar, Masiá et al. (2015) testou PLE e QuEChERS na extração de agrotóxicos de solo, sedimento e lodo de esgoto, empregando LC-MS/MS para a determinação dos analitos. As principais modificações realizadas no método QuEChERS foram a redução da quantidade de amostra para 1 g e *clean-up* empregando PSA e C18. As recuperações obtidas a partir de fortificação do solo com $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ foi de 73% para CBD, 80% para DIU, 84%, 77% e 75% para ATZ, DEA e DIA, respectivamente.

O uso de detectores convencionais para a determinação de agrotóxicos empregando QuEChERS como preparo de amostras tem sido menos frequentemente encontrado na literatura (RAHMAN et al., 2017). O único trabalho que emprega QuEChERS e detecção por LC-UV e amperométrico foi proposto por De Carlo et al. (2015). Após diversas modificações no método QuEChERS para determinar alguns fármacos e agrotóxicos em solo, o método otimizado utilizou 5 g de solo, extração com acetonitrila:H₂O na proporção de 70:30 com 5% de ácido acético e partição empregando 4 g MgSO₄ e 1 g NaCl. O *clean-up* foi executado empregando 250 mg de C18 como sorvente. As taxas de recuperação foram obtidas na faixa de 83 a 113% com RSD<14% para a detecção por UV e os limites de detecção e quantificação atingidos para ATZ foram de 84 e $280 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Como pode ser observado, limites de quantificação altos foram obtidos uma vez que a pré-concentração não está comumente envolvida neste tipo de preparo de amostra.

Portanto, sabe-se que a extração de agrotóxicos de amostras de solo é uma tarefa laboriosa devido a elevada complexidade da matriz, baixas concentrações dos analitos e diversidade de tipos de interação entre os analitos e os componentes do solo. A fim de se propor um procedimento mais simples e rápido, o método QuEChERS foi investigado a partir da introdução de modificações nas suas condições originais, principalmente na tentativa de agregar a pré-concentração dos agrotóxicos.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Reagentes e equipamentos

Com o objetivo de desenvolver uma análise multirresíduo, representantes de diversas classes foram selecionados: herbicidas (atrazina – ATZ e seus metabólitos, desetilatrazina – DEA, e desisopropilatrazina – DIA, diuron – DIU), inseticidas (carbaril – CBL) e fungicida (carbendazim – CBD). Os padrões de agrotóxicos (pureza > 99%, Tabela 3.1) foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St Louis, MO, EUA). A acetonitrila e o metanol grau HPLC foram adquiridos a J.T. Baker® (Philipsburg, NJ, EUA). A água de osmose reversa foi adquirida através de um sistema de osmose reversa Quimis® Q842 (Diadema, SP). A água deionizada foi obtida com um sistema Milli-Q® equipado com uma lâmpada UV (18,2 MΩ cm, Bedford, MA, EUA), alimentado com a água de osmose reversa. Os reagentes empregados na extração QuEChERS como o sulfato de magnésio anidro (MgSO₄), cloreto de sódio (NaCl) foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St Louis, MO, EUA); sorventes para o *clean-up*, amina secundária primária (PSA, 50 µm), octadecilsilano (C18, 40 – 63 µm) e silicato de magnésio, Florisil® (149 – 210 µm) foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St Louis, MO, EUA), Agilent® (Santa Clara, EUA) e Química Moderna (Barueri, SP, Brasil), respectivamente. Os extratos de acetonitrila foram secos sob fluxo de nitrogênio (90% de pureza) fornecidos pela Air Liquide. As extrações foram conduzidas em tubos de polipropileno (15 mL) com tampas rosqueáveis (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil). As amostras foram filtradas previamente a análise cromatográfica em uma unidade filtrante de polifluoreto de vinilideno (PVDF) com diâmetro de 13 mm e porosidade de 0,2 µm. (Vertical, Bangkok, Tailândia)

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se vidraria analítica previamente calibrada. As vidrarias utilizadas para análise por LC foram lavadas com álcool etílico comercial, água da torneira e deixadas por 24 horas em banho com solução de Extran® (Merck, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 2%. As vidrarias retiradas do banho de Extran® foram imediatamente enxaguadas de forma abundante com água de osmose reversa e seguiram para o banho com ácido nítrico 10% por até 24 horas. Em seguida, foram novamente enxaguadas com água de osmose reversa, água deionizada e secas ao ar ou em estufa.

3.2.2 Preparo das soluções

Soluções estoque de cada um analitos foram preparadas a cada três meses na concentração de 100 mg L^{-1} em metanol. Estes padrões foram mantidos ao abrigo da luz e sob refrigeração ($-20,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$). A partir destas soluções estoque, foram preparadas diariamente soluções trabalho por diluição em água deionizada ou solvente apropriado. Para os padrões de calibração, foram preparadas soluções na fase móvel composta por 20% de metanol e 80% de água deionizada. As soluções empregadas para a fortificação do solo foram preparadas em acetonitrila nas concentrações de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ e $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

3.2.3 Condições cromatográficas

As determinações foram realizadas em um equipamento de HPLC Agilent 1260 Infinity (Santa Clara, EUA) com um injetor automático G1329B 1260ALS, bomba quaternária G1311C 1260 VL, um detector por arranjo de diodos G1315C 1260DAD VL+ (volume da célula de fluxo de $18 \text{ } \mu\text{L}$) e um detector por fluorescência G1321B (volume da célula de fluxo $8 \text{ } \mu\text{L}$). Os cromatogramas foram adquiridos e processados usando o software OpenLab EZChrom Elite. A separação dos analitos foi realizada em uma coluna ZORBAX Eclipse XDB-C18 Analytical ($4,6 \times 50 \text{ mm}$, $5 \text{ } \mu\text{m}$) com coluna de guarda de mesma fase estacionária ($12,5 \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \text{ } \mu\text{m}$). As fases móveis foram previamente filtradas em membrana de PTFE $0,45 \text{ } \mu\text{m}$ (Macherey Nagel) e desgaseificadas em um Ultrassom Ultracleaner 1400 (Unique, Indaiatuba, SP, Brasil).

O desenvolvimento cromatográfico foi baseado em artigos da literatura (BEDASSA; GURE; MEGERSA, 2015; CAPPELINI et al., 2012) e em trabalhos desenvolvidos pelos Grupo de Técnicas Avançadas para Tratamento de Resíduos (TECNOTRATER) e Grupo de Análise Química e Quimiometria (GAQQ). A eluição otimizada para determinação simultânea de DIA, DEA, ATZ, DIU, CBD e CBL, com vazão constante de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$, por modo gradiente, na qual as fases móveis empregadas foram metanol (fase A) e água deionizada (fase B). A composição inicial de 20% A foi aumentada linearmente até 65% A em 17 minutos. A seguir, a condição inicial foi alcançada em 5 minutos e mantida por 6 minutos. O tempo total de corrida foi 28 minutos, com $15 \text{ } \mu\text{L}$ de volume de injeção de amostra e a temperatura da coluna mantida em 35°C . A detecção foi realizada nos comprimentos de onda 215 nm (DIA e

DEA), 220 nm (CBL e ATZ), 254 nm (DIU) e 280 nm (CBD). Os analitos CBD e CBL apresentaram sinal de fluorescência com excitação em 280 nm e emissão em 300 e 330 nm, respectivamente. Curvas analíticas foram construídas em fase móvel na faixa de 2,5 a 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ e utilizadas para estimar a concentração dos analitos durante a etapa de otimização.

3.2.4 Preparo das amostras de solo

A amostra escolhida para avaliar o método QuEChERS frente a extração de agrotóxicos foi o solo. As amostras de solo (latossolo vermelho distroférico) foram gentilmente cedidas pelo prof. Dr. Gilberto Abate e foram amostradas no município de Pato Branco, sudoeste do Estado do Paraná (430 km da capital do Estado), em região sem histórico de aplicação de herbicidas ou outro agrotóxico. A caracterização físicoquímica das amostras de solo foi realizada em outro trabalho (AMADORI et al., 2013). De forma geral, as amostras de solo são consideradas de textura argilosa (75% de argila) e o teor de matéria orgânica médio foi 4,2%. Os valores de pH das amostras de solo medidos em CaCl_2 foi de 5,0. Essas propriedades influenciam fortemente o tipo de processo sortivo dos agrotóxicos no solo.

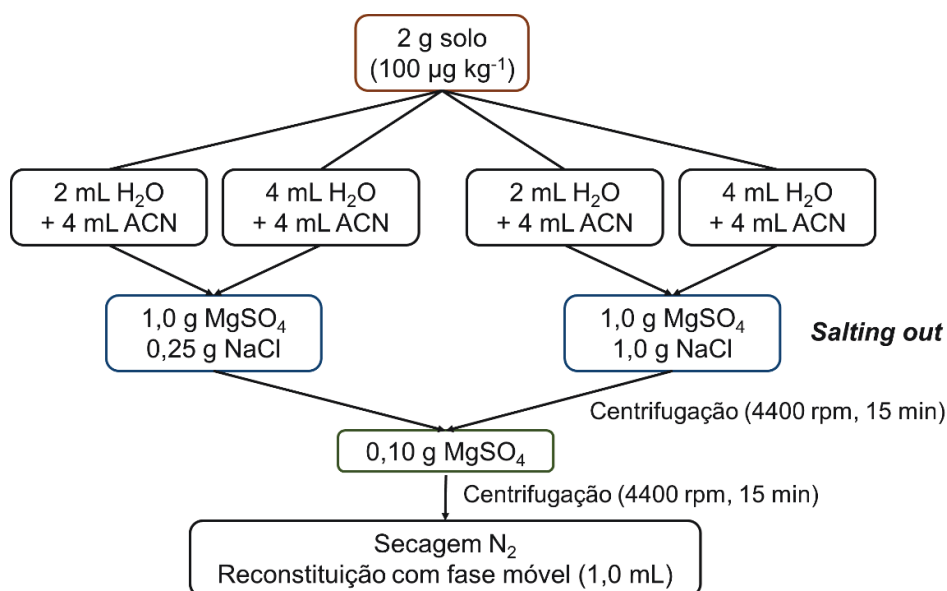
As amostras foram secas em estufa a 30°C por dois dias, destorroadas, trituradas em almofariz e peneiradas para separar fração granulométrica menor que 2 mm. A seguir, as amostras seguiram novamente para a estufa a 40°C por 24 horas, foram homogeneizadas e conservadas em embalagem plástica a temperatura ambiente. As amostras foram submetidas ao processo de extração inicial para verificar a ausência dos agrotóxicos de interesse.

Para a otimização do método de extração das amostras de solo, a fortificação foi realizada com uma alíquota de concentrações conhecida dos analitos preparada em acetonitrila. Cada amostra foi homogeneizada em vortex por um minuto e mantidas por 1 hora a temperatura ambiente para evaporação do solvente e contato dos analitos com a matriz.

3.2.5 Otimização do método QuEChERS

Inicialmente, alguns ensaios foram realizados para nortear algumas condições do método QuEChERS como as proporções de amostra, água e acetonitrila adicionadas, e quantidades de sais como mostrada no fluxograma da Figura 3.1.

FIGURA 3.1 - FLUXOGRAMA DO MÉTODO QuEChERS AVALIADO PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE SOLO (NÍVEL DE FORTIFICAÇÃO: $100 \mu\text{g kg}^{-1}$; N=2)



Inicialmente, 2,0 g de solo fortificadas no nível de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ foram utilizadas com diferentes proporções de água e acetonitrila (nas proporções de 1:1 e 1:2 de $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$). Dois níveis de NaCl (0,25 e 1,0 g) também foram avaliados. Essa investigação preliminar não contou com a etapa de *clean-up*, pois esta foi avaliada posteriormente. Essas condições preliminares foram baseadas na literatura e na redução das quantidades para minimização do método.

A partir das indicações do ensaio preliminar, optou-se por realizar um planejamento fatorial 2^4 com quadruplicata do ponto central para avaliação da melhor condição de extração destes agrotóxicos do solo. Os ensaios foram realizados de acordo com os níveis e a matriz de planejamento apresentada na Tabela 3.2, sem a fase sorvente na etapa de *clean-up* (apenas 100 mg do agente secante MgSO_4). A quantidade de MgSO_4 não foi otimizada e foi mantida em 1,0 g para todos os experimentos.

TABELA 3.2 - FATORES, NÍVEIS E MATRIZ DO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL 2⁴ COM QUADRUPLICATA DO PONTO CENTRAL (NÍVEL DE FORTIFICAÇÃO: 200 µg kg⁻¹)

Fator	Nível			
	-1	0	1	
Quantidade de solo/ g	1,0	1,5	2,0	
Volume H ₂ O / mL	2,0	3,0	4,0	
Volume ACN / mL	2,0	3,0	4,0	
Quantidade de NaCl / g	0,5	1,0	1,5	
Ensaio	Solo	V _{H2O}	V _{ACN}	NaCl
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1
17-20	0	0	0	0

Os dados do planejamento foram utilizados para calcular o efeito de cada fator estudado. Os gráficos de Pareto foram construídos no programa Statistica 7.0 (Statsoft, USA).

Após determinar as melhores condições de extração via planejamento (1 g solo, 4,0 mL H₂O, 2 mL ACN e 0,50 g NaCl), investigou-se a etapa de *clean-up* do método QuEChERS. Os sorventes selecionados foram florisil, C18 e PSA. Os ensaios foram realizados em triplicata empregando 50 mg de fase sorvente com amostras fortificadas em 200 µg kg⁻¹. Os resultados obtidos foram comparados com ensaios sem *clean-up* (tubos contendo apenas 100 mg de MgSO₄) em termos de valores de recuperação e precisão obtidos.

Em seguida, a partir da escolha de PSA como sorvente, realizou-se um estudo da variação da quantidade de PSA em função da diminuição da concentração dos analitos. As concentrações dos analitos decresceram de 200 para 100, 50 e 25 µg kg⁻¹ para cada quantidade de PSA estudada as quais compreenderam 50, 25 e

10 mg. Optou-se por fazer um estudo de forma univariada uma vez que se pretendia observar uma possível adsorção dos analitos.

Por fim, avaliou-se o volume de reconstituição do extrato após secagem com N₂. Os volumes estudados foram 100, 250, 500 e 1000 µL (este último utilizado anteriormente à etapa de sua otimização). Os resultados foram avaliados em termos de recuperação dos analitos e os desvios padrão relativo obtidos em cada caso.

Todas as respostas foram calculadas em termos de recuperação aparente (R'_A) conforme recomendada pela IUPAC (BURNS; DANZER; TOWNSHEND, 2002). Como a concentração obtida é dependente da inclinação da reta e esta foi construída inicialmente em fase móvel, o uso da recuperação aparente é mais plausível para expressar o valor observado a partir da extração dos agrotóxicos de amostras de solo empregando QuEChERS. O valor da recuperação aparente foi obtido como:

$$R'_A = \frac{x_{obs}}{x_{ref}} \times 100 \quad \text{Eq. 3.1}$$

onde, x_{obs} foi o valor de concentração obtido após extração por interpolação com a curva analítica construída em solvente e x_{ref} o valor da fortificação.

3.2.6 Validação do método QuEChERS-LC-DAD

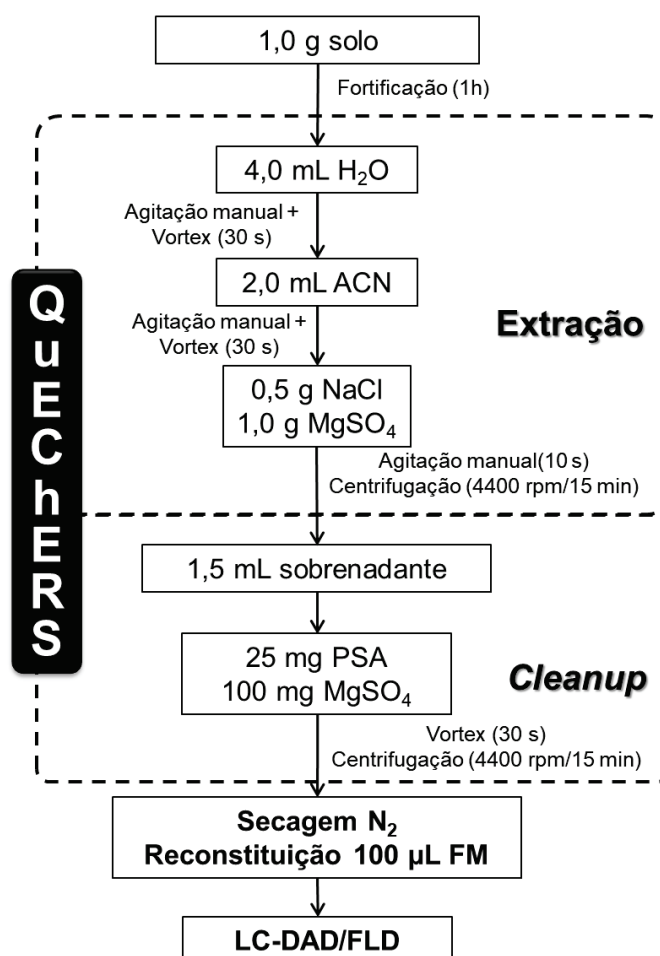
O método otimizado está resumido no fluxograma da Figura 3.2. Inicialmente, pesou-se $1,0 \pm 0,01$ g de solo em tubos de polipropileno (15 mL). A seguir, as amostras foram fortificadas em dois níveis (LOQ: DIA: 10 µg kg⁻¹; DEA: 15 µg kg⁻¹; CBD: 20 µg kg⁻¹; CBL: 5 µg kg⁻¹; ATZ: 15 µg kg⁻¹; DIU: 15 µg kg⁻¹ e 10 x LOQ) e homogeneizadas através da agitação em vortex por 1 min. Os solos fortificados foram mantidos a temperatura ambiente por 1 h antes da extração, para que houvesse certo tempo de contato e interação dos analitos com a matriz, além de permitir a evaporação do solvente.

Após o período de contato, 4,0 mL de água deionizada foram adicionados ao tubo com auxílio de uma micropipeta e agitados manualmente para a hidratação completa do solo e, posteriormente, em vortex. 2,0 mL de acetonitrila foram adicionados em cada tubo, os quais foram novamente agitados em vortex por 30 s. Logo após a homogeneização, adicionou-se $1,00 \text{ g} \pm 0,01 \text{ g}$ de MgSO₄ e $0,50 \text{ g} \pm 0,01$

g de NaCl e repetiu-se a agitação manual em vortex e seguiu-se para centrifugação a 4400 rpm durante 15 min.

Na etapa de *clean-up*, 1,5 mL de acetonitrila foram transferidas para outro tubo de polipropileno (15 mL) contendo 25 mg \pm 1 mg de PSA e 100 mg \pm 1 mg de MgSO₄ anidro, previamente pesados. Os tubos foram agitados em vortex e centrifugados como anteriormente. 1,0 mL foi coletado, filtrado em filtro seringa de PVDF 0,22 μ m diretamente em vial e seco sob fluxo suave de nitrogênio. Finalmente, as amostras foram reconstituídas com a proporção inicial da fase móvel (20% metanol) e analisadas por LC-DAD/FLD.

FIGURA 3.2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MÉTODO QuEChERS EMPREGADO NA DETERMINAÇÃO DOS RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM SOLO



O método foi validado segundo critérios dos documentos SANTE/11945/2015 e SANCO/825/00 (SANCO, 2010; SANTE/EU, 2015). Os parâmetros avaliados foram linearidade, limite de quantificação, exatidão, precisão, seletividade e robustez.

A linearidade foi estudada na faixa entre 1,0 e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ($n=6$) utilizando o método de superposição de matriz. As curvas analíticas foram construídas com pelo menos cinco níveis de concentrações. O ajuste linear para cada analito foi expresso pela equação da reta e coeficiente de determinação (R^2), calculados a partir do método de mínimos quadrados ordinários (MMQO), e análise dos resíduos quanto a aleatoriedade, homocedasticidade e independência.

O limite de quantificação (LOQ) correspondeu ao menor nível da curva analítica, sendo a menor concentração possível de detectar com exatidão (70 – 120%) e precisão ($\text{RSD} \leq 20\%$) adequados (SANCO, 2010).

A exatidão foi avaliada pela recuperação relativa (%) de amostras fortificadas em dois níveis, no valor estabelecido para o LOQ (DIA: 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$; DEA: 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$; CBD: 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$; CBL: 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$; ATZ: 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$; DIU: 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e 10 x LOQ analisados em quintuplicata. A porcentagem de recuperação foi calculada de acordo com a Eq. 1.7.

A precisão do método foi estudada através da repetibilidade e precisão intralaboratorial (expressas pelo RSD) nos mesmos níveis de concentrações dos ensaios de recuperação. No caso da precisão intermediária realizaram-se ensaios em dias diferentes.

A seletividade foi conduzida por comparação dos tempos de retenção dos analitos (t_R) e dos espectros dos analitos em solvente e na matriz aquosa.

A robustez foi estimada empregando um planejamento fracionário Plackett-Burman. Os fatores e níveis selecionados estão na Tabela 3.3. A matriz de planejamento foi realizada de acordo com a matriz mostrada na Tabela 2.3 do capítulo anterior. As amostras foram fortificadas em um nível de 5 x LOQ (DIA: 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$; DEA: 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$; CBD: 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$; CBL: 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$; ATZ: 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$; DIU: 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$) e foi avaliada em termos de recuperação relativa dos analitos.

TABELA 3.3 - FATORES E NÍVEIS EMPREGADOS NO PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN PARA A AVALIAÇÃO DE ROBUSTEZ DO MÉTODO QuEChERS EM SOLO

	Fatores	Nível		
		-1	0	1
A	Massa de solo / g	0,98	1,00	1,02
B	Tempo de fortificação / min	45	60	75
C	Tempo agitação (extração) / s	15	30	45
D	Tempo de centrifugação (extração) / min	12	15	18
E	Quantidade de PSA / mg	24	25	26
F	Temperatura de secagem / °C	28	30	32
G	Vazão / mL min ⁻¹	0,58	0,60	0,62
H	% fase móvel inicial	19	20	21

3.2.7 Aplicação do método desenvolvido em amostras reais

O método desenvolvido e validado foi aplicado na determinação de atrazina e seus metabolitos, carbaril, carbendazim e diuron em seis amostras de solo utilizado para o cultivo de soja e milho. O solo utilizado foi coletado na região oeste do Paraná, no município de Toledo (Bacia Hidrográfica do Paraná 3, microbacia Esquina Memória I, 24°48'53.34"S, 53°33'25.24"O) entre os meses de setembro e outubro de 2017 (uma amostragem por semana) após período de aplicação de agrotóxicos (última semana de agosto de 2017). Entre os agrotóxicos usualmente empregados nessa região estão atrazina e carbendazim. A amostragem foi realizada na profundidade de 1-10 cm e de maneira composta para a obtenção de uma amostra real (somatório de 15 sub amostras para cada amostra real).

O solo foi classificado como sendo 50,3% latossolo vermelho distroférrico típico e 49,7% nitossolo vermelho eutroférrico com classe textural argilosa. As principais características do solo estão na Tabela 3.4 e foram realizadas no laboratório de solos da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ (Piracicaba/SP).

TABELA 3.4 - RESULTADOS DAS ANÁLISES QUÍMICA E GRANULOMÉTRICA DO SOLO E INDICAÇÃO DA CLASSE TEXTURAL, DOS HORIZONTES AVALIADOS DO SOLO NA ÁREA EXPERIMENTAL

Determinações	Resultado	Determinações	Resultado
Camada / cm	0-15	Al / mmolc kg ⁻¹	<0,6
pH (H ₂ O)	5,6	CTC / mmolc kg ⁻¹	128,4
M.O. / %	3,8	V / %	49
K / mmolc kg ⁻¹	1,4	Areia / %	8,6
Ca / mmolc kg ⁻¹	43	Silte / %	25,9
Mg / mmolc kg ⁻¹	19	Argila / %	65,6
Fe / mg kg ⁻¹	24,15	Classe Textural	Muito argilosa

M.O. - Matéria Orgânica; CTC – Capacidade de Troca de Cátions; V – Saturação por bases.

As amostras foram mantidas em freezer (-20°C) até o momento da análise. Antes da extração, de acordo com o procedimento otimizado (Figura 3.2), as amostras foram submetidas ao mesmo procedimento de secagem e homogeneização descrito no item 3.2.4 e analisadas de acordo com o procedimento otimizado.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

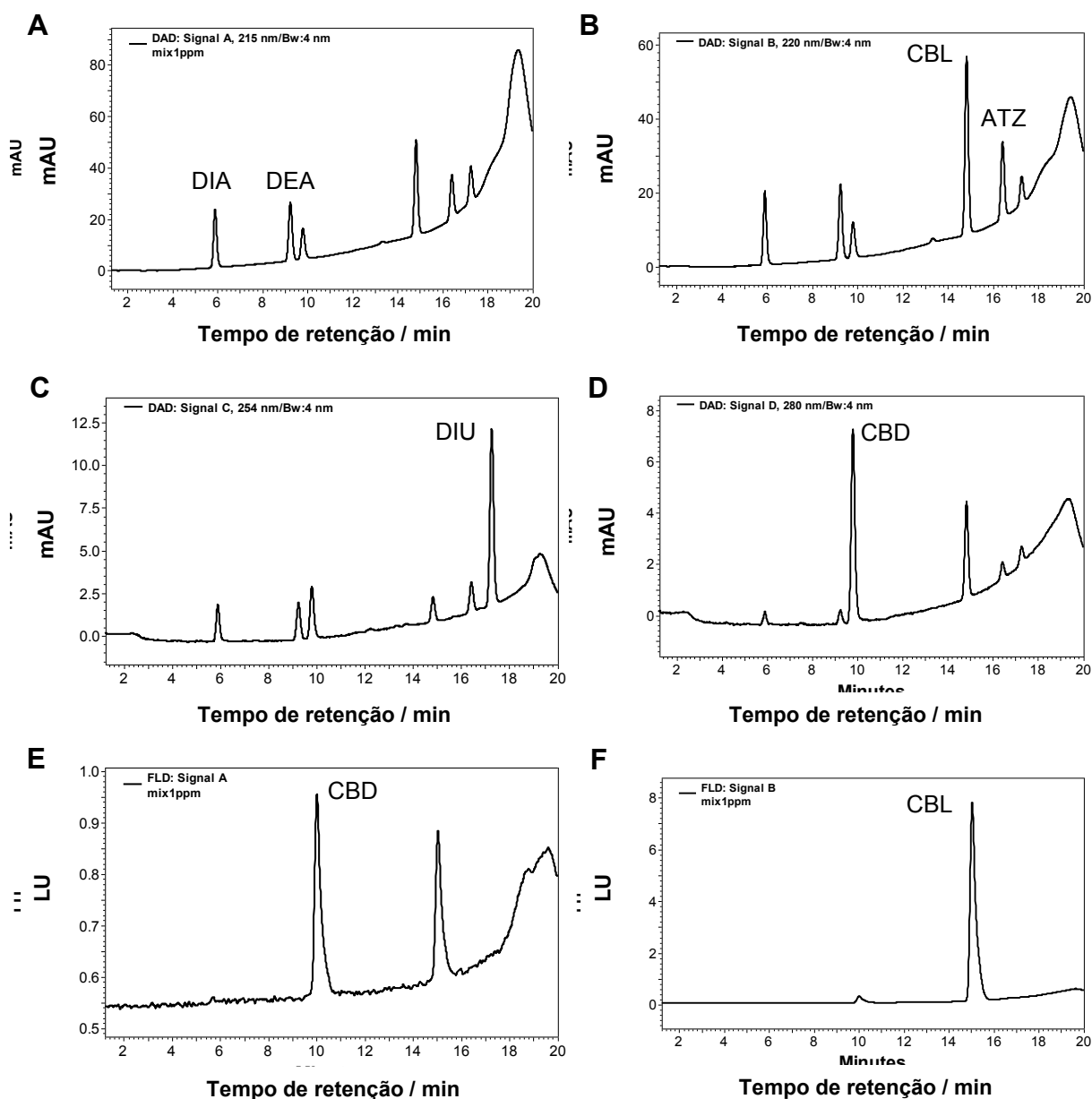
3.3.1 Otimização das condições cromatográficas

A separação dos agrotóxicos estudados no presente trabalho foi adaptada de outros métodos já desenvolvidos no grupo. Inicialmente, o método empregando acetonitrila e água como fase móvel não permitiu a separação cromatográfica dos analitos carbendazim e DEA (em aproximadamente 5 min) e carbaril, atrazina e diuron (cerca de 12 min), sendo observada a coeluição em todos os gradientes testados. Por outro lado, quando metanol foi empregado, uma separação cromatográfica adequada dos analitos foi conseguida, sendo esse solvente selecionado para compor a fase móvel. Ainda, quando experimentos foram realizados adicionando o controle do pH do sistema nenhum ganho significativo na separação foi conseguido.

Com base nesses ensaios, a fase móvel de metanol e água foi empregada no modo de eluição por gradiente, iniciando com 20% de metanol, conforme descrito no item 3.2.3. A temperatura foi mantida em 35°C para garantir a resolução dos pares que apresentaram problemas de coeluição em outras condições.

Para a maioria dos analitos, o sistema de detecção utilizado foi o DAD, sendo o comprimento de onda empregado para monitorá-los mostrado na Tabela 3.5. Dois dos agrotóxicos em estudo apresentam sinal de fluorescência (carbendazim e carbaril). Entretanto, apenas o sinal do carbaril foi reprodutível na faixa de concentração avaliada. O sinal do carbendazim (λ_{EX} : 280 nm; λ_{EM} : 300 nm) foi utilizado apenas para confirmação do mesmo. Os cromatogramas da Figura 3.3 mostram o sinal analítico obtido para cada analito empregando as condições selecionadas.

FIGURA 3.3 - CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA O MÉTODO CROMATOGRÁFICO LC-DAD PARA DETERMINAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM CADA UM DOS COMPRIMENTOS DE ONDA AVALIADOS A) 215 nm, B) 220 nm, C) 254 nm, D) 280 nm, E) FLD A (λ_{EX} : 280 nm; λ_{EM} : 300 nm) E F) FLD B (λ_{EX} : 280 nm; λ_{EM} : 300 nm). CONCENTRAÇÃO DOS ANALITOS: 1,0 mg L⁻¹.



A partir do método cromatográfico desenvolvido, investigou-se a faixa linear de concentração e os limites de quantificação instrumentais (LOQ_i) calculados a partir dos parâmetros da curva analítica (Tabela 3.5).

TABELA 3.5 - FIGURAS DE MÉRITO PARA A DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS AGROTÓXICOS POR LC-DAD/FLD

Analito	Deteccção	$t_R^*/$ min	Equação da reta	R^2	FCL ^{**} / $\mu\text{g L}^{-1}$	LOQ _i [#] / $\mu\text{g L}^{-1}$
DIA	215 nm	5,88	$y = 450,3 C_{\text{DIA}} - 612,2$	0,9999	15 – 600	12,7
DEA	215 nm	9,21	$y = 515,2 C_{\text{DEA}} - 965,3$	0,9999	10 – 600	2,35
CBD	280 nm	9,80	$y = 181,8 C_{\text{CBD}} + 226,6$	0,9999	10 – 600	0,93
CBL	λ_{EX} : 280 nm λ_{EM} : 330 nm	14,9	$y = 24615 C_{\text{CBL}} + 6634$	0,9999	2,5 – 600	1,36
ATZ	220 nm	16,4	$y = 471,0 C_{\text{ATZ}} - 1499$	0,9999	10 – 600	8,31
DIU	254 nm	17,2	$y = 232,3 C_{\text{DIU}} - 318,5$	0,9999	20,7 – 600	20,7

* tempo de retenção

**FCL: Faixa de Concentração Linear.

#LOQ_i: limite de quantificação instrumental; calculado com base nos parâmetros da curva analítica (ICH, 2005)

As curvas analíticas obtidas podem ser consideradas lineares na faixa de concentração avaliada, já que apresentaram coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,999 para todos os analitos. Ainda, por meio do coeficiente angular das equações obtidas pode-se estimar a sensibilidade do método cromatográfico, o qual mostrou-se mais sensível para o analito passível de determinação por fluorescência, CBL, seguido de DEA, ATZ e DIA.

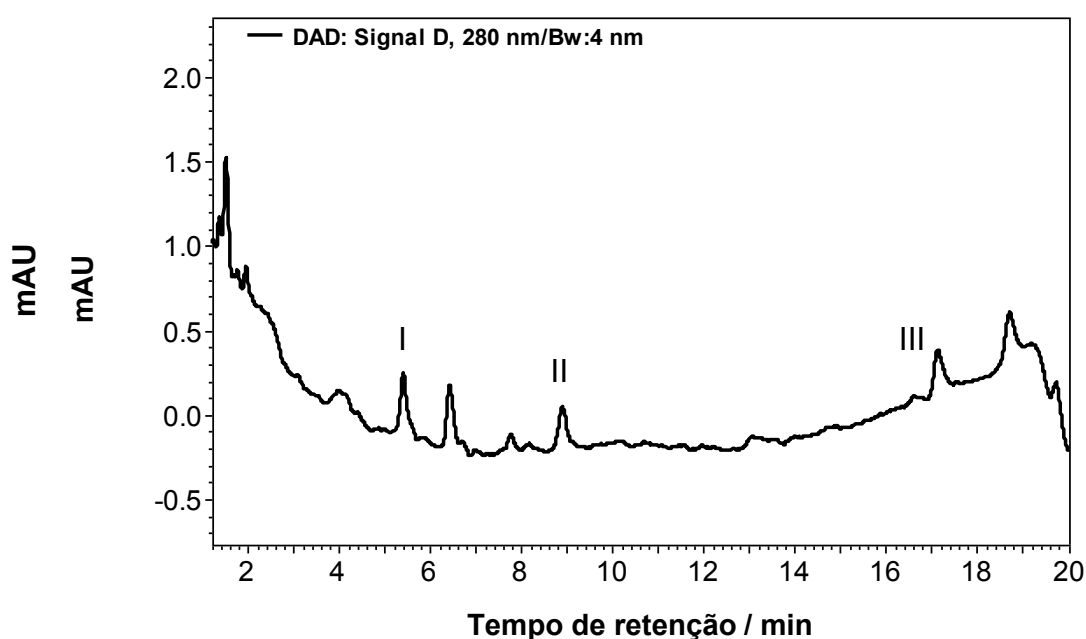
Através das curvas preparadas em solvente, seleccionou-se um valor de concentração quantificável para as fortificações realizadas nas etapas de otimização do método de extração (100 e/ou 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Em geral, os níveis de fortificação apresentados na literatura são mais elevados da ordem de mg kg^{-1} (DE CARLO et al., 2015; MARTINS et al., 2014). Entretanto, visto que o objetivo do método é determinar concentrações da ordem de $\mu\text{g kg}^{-1}$, optou-se por manter a concentração de fortificação em um nível mais realista. As respostas obtidas para comparação dos ensaios foram calculadas em termos de recuperação aparente, como descrito no item 3.2.5.

3.3.2 Otimização do método QuEChERS para extração de agrotóxicos de solo

Para avaliar a capacidade de extração do QuEChERS em solo, amostras “branco” de solo foram fortificadas na concentração de 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ conforme o fluxograma da Figura 3.1.

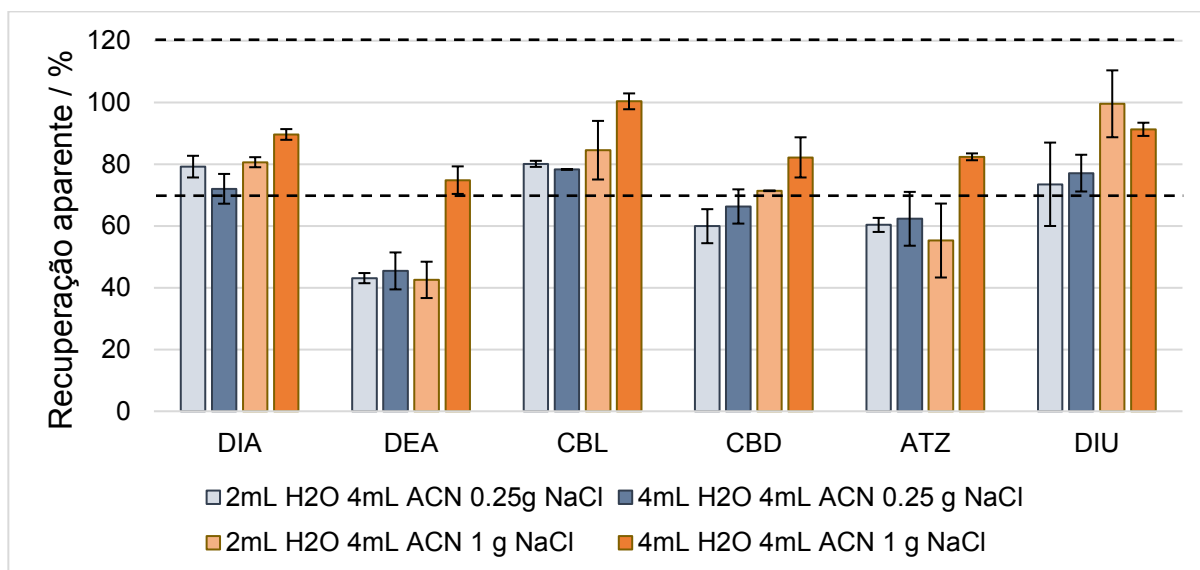
Para a amostra branco (sem a fortificação com os agrotóxicos), observou-se a presença de alguns sinais de baixa intensidade, mas em tempos de retenção diferentes das espécies de interesse estudadas. Na Figura 3.4 é mostrado um cromatograma para análise do branco de solos obtido em 280 nm. Os picos presentes em tempos de retenção de 5,40 (I), 8,96 (II) e 16,6 (III) min foram identificados como os sinais que mais poderiam ter influência na determinação de DIA, DEA e DIU respectivamente.

FIGURA 3.4 - CROMATOGRAMA EM 280 NM OBTIDO PARA ANÁLISE DA AMOSTRA BRANCO DE SOLO ATRAVÉS DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO LC-DAD, SENDO I, II E III OS INTERFERENTES MAJORITÁRIOS



Em geral, estes testes preliminares mostraram baixos valores de recuperação aparente (Figura 3.5) para DEA e ATZ para a maioria das condições avaliadas, exceto para a condição empregando a proporção água e acetonitrila de 1:1 e 1,0 g de NaCl, a qual apresentou recuperações de 74,8 e 82,4%, respectivamente, e RSD inferior a 6,0% para esses analitos. Para o CBD, recuperação aparente média inferior a 70% foi obtida nos ensaios empregando 0,25 g de NaCl. Para os demais analitos, todas as condições satisfizeram recuperações na faixa de 70 a 100% com RSD abaixo de 12%.

FIGURA 3.5 - RECUPERAÇÕES APARENTES OBTIDAS PARA AVALIAÇÃO INICIAL DO MÉTODO QuEChERS APLICADO PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS EM AMOSTRAS DE SOLO (2,0 g DE SOLO; NÍVEL DE FORTIFICAÇÃO: 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$; n=2).



Os resultados obtidos mostraram ainda que a utilização de apenas 2 g de solo e 2 mL de água para hidratação levou a maiores estimativas de desvio padrão, principalmente para o DIU. Nesses ensaios, foi observada uma maior dificuldade de separação das fases aquosa e orgânica, devido a formação de uma grande quantidade emulsão entre as fases. A presença de argila, ácidos húmicos e óxidos de ferro e alumínio no solo podem contribuir para a formação da emulsão coloidal, dependendo das condições da solução. Principalmente no caso dos ácido húmicos, eles podem se auto-organizar e acumular na interface da solução, uma vez que, apesar de não apresentarem estrutura definida, são consideradas como associações supramoleculares (PICCOLO, 2001) podendo formar estruturas similares a micelas (SUTTON; SPOSITO, 2005). Assim, os analitos podem ficar presos na própria emulsão formada ou ainda dentro das redes tridimensionais do ácido húmico. Nesse caso, observou que o tempo, mas principalmente, o tipo de agitação (manual ou vortex) após a adição de sal foi fator fundamental na formação dessa emulsão. A menor formação de emulsão foi observada pela agitação manual intensa logo após a adição dos sais para *salting out*. Com base nisso, essa condição foi mantida para todos os experimentos.

Como as condições empregadas nos ensaios afetaram de forma distinta os analitos estudados, optou-se por analisar as variáveis solo, volume de água e

acetonitrila e quantidade de NaCl em um planejamento fatorial 2^4 para seleção de uma condição otimizada para todos os agrotóxicos.

3.3.2.1 Otimização das condições de extração de agrotóxico de solo empregando planejamento fatorial 2^4

O planejamento fatorial foi selecionado para otimizar a etapa de extração do método QuEChERS uma vez que muitos fatores estão envolvidos nessa etapa, influenciando diretamente na eficiência de extração dos agrotóxicos de interesse e podendo apresentar efeito individual ou combinado a partir da interação dos mesmos.

Os resultados obtidos em termos de recuperação aparente dos analitos para todos os ensaios do planejamento estão na Tabela 3.6. A partir da quadruplicata do ponto central observou-se que, apesar da complexidade da matriz, o RSD não foi superior a 7,67%, mostrando uma baixa dispersão dos resultados, que se encontram dentro do esperado (<20%) para a análise.

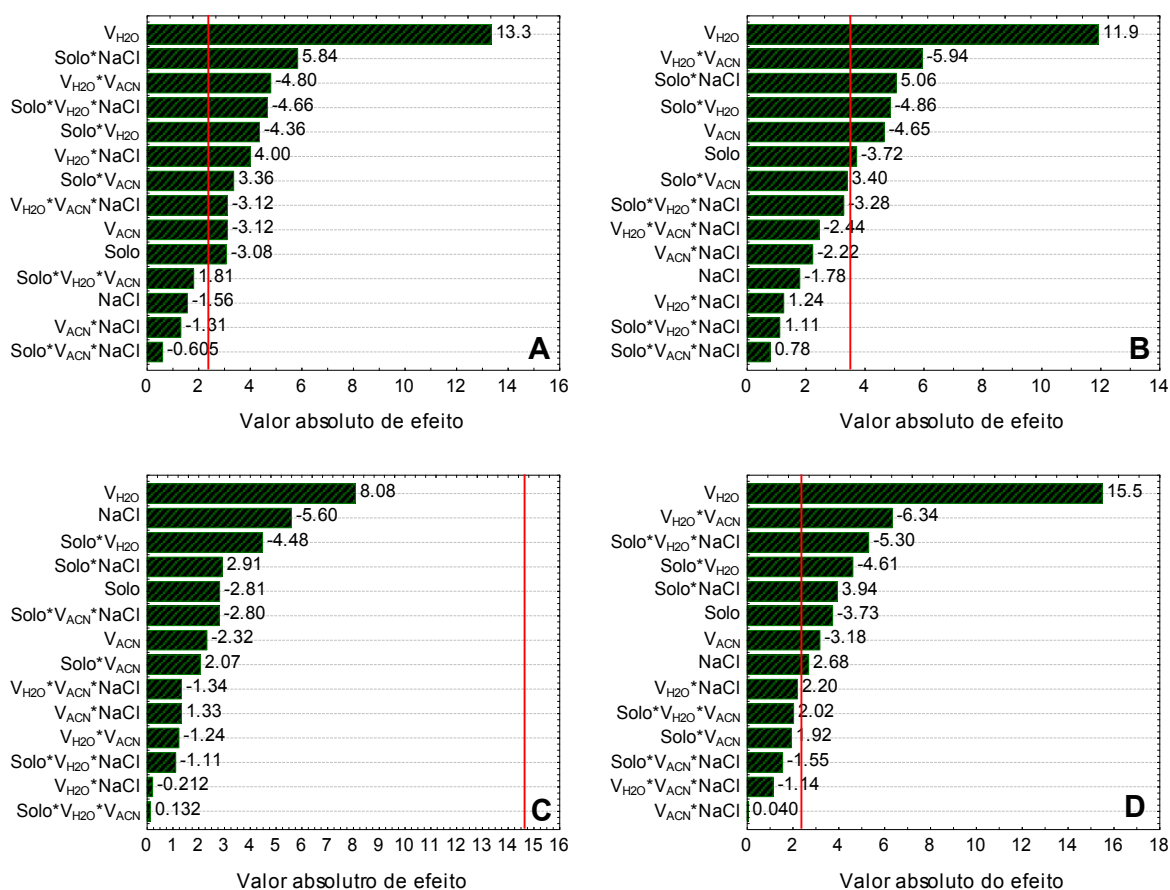
TABELA 3.6- RECUPERAÇÕES APARENTES OBTIDAS PARA OS ANALITOS EM ESTUDO NO ENSAIO DE OTIMIZAÇÃO EMPREGANDO PLANEJAMENTO 2^4 (AMOSTRA FORTIFICADA COM 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ DOS ANALITOS)

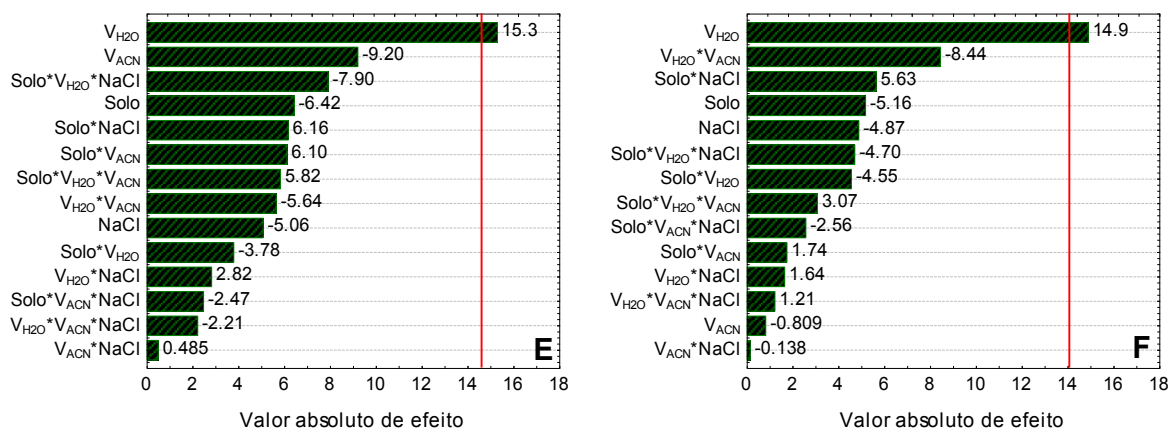
ENSAIO	Recuperação aparente / %					
	DIA	DEA	CBD	CBL	ATZ	DIU
1	92	72	63	87	92	91
2	78	60	54	76	72	78
3	102	86	73	105	109	116
4	90	74	60	95	86	98
5	87	69	53	86	82	98
6	82	65	57	81	69	89
7	95	79	66	93	82	99
8	90	70	60	90	87	95
9	71	58	46	74	64	72
10	84	67	54	88	78	86
11	109	92	64	113	108	109
12	96	77	58	99	86	97
13	76	59	50	82	66	83
14	86	69	54	88	75	88
15	90	68	59	98	82	98
16	90	70	55	93	80	92
17-20	91	74	60	94	82	93
RSD ponto central / %	0,8	1,5	7,7	2,0	0,8	5,6
Nível de significância*	2,3	3,6	15	2,4	15	14

*Calculado como estimativa do desvio padrão $\times t_{(v=3)}$ de Student (3,18)

O aumento da quantidade de solo refletiu em uma diminuição da porcentagem de recuperação para todos os analitos na maioria dos ensaios. Por exemplo, comparando os resultados para os ensaios 1 e 2, para os quais 1,0 e 2,0 g de solo foram utilizadas, respectivamente, e os demais fatores se mantiveram no mesmo nível (Tabela 3.2), observa-se uma diminuição nos valores de recuperação. Esses resultados têm maior impacto sobre os analitos que apresentaram as recuperações mais baixas (DEA e CBD. Este e os demais efeitos calculados estão apresentados nos gráficos de Pareto (Figura 3.6).

FIGURA 3.6 – GRÁFICOS DE PARETO EM TERMOS DE VALORES ABSOLUTOS DE EFEITO PARA OS EFEITOS PRINCIPAIS E DE INTERAÇÃO OBTIDOS A PARTIR DO PLANEJAMENTO 2⁴ PARA A) DIA, B) DEA, C) CBD, D) CBL, E) ATZ E F) DIU. O NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA PARA CADA ANALITO É REPRESENTADO PELA LINHA VERTICAL VERMELHA.



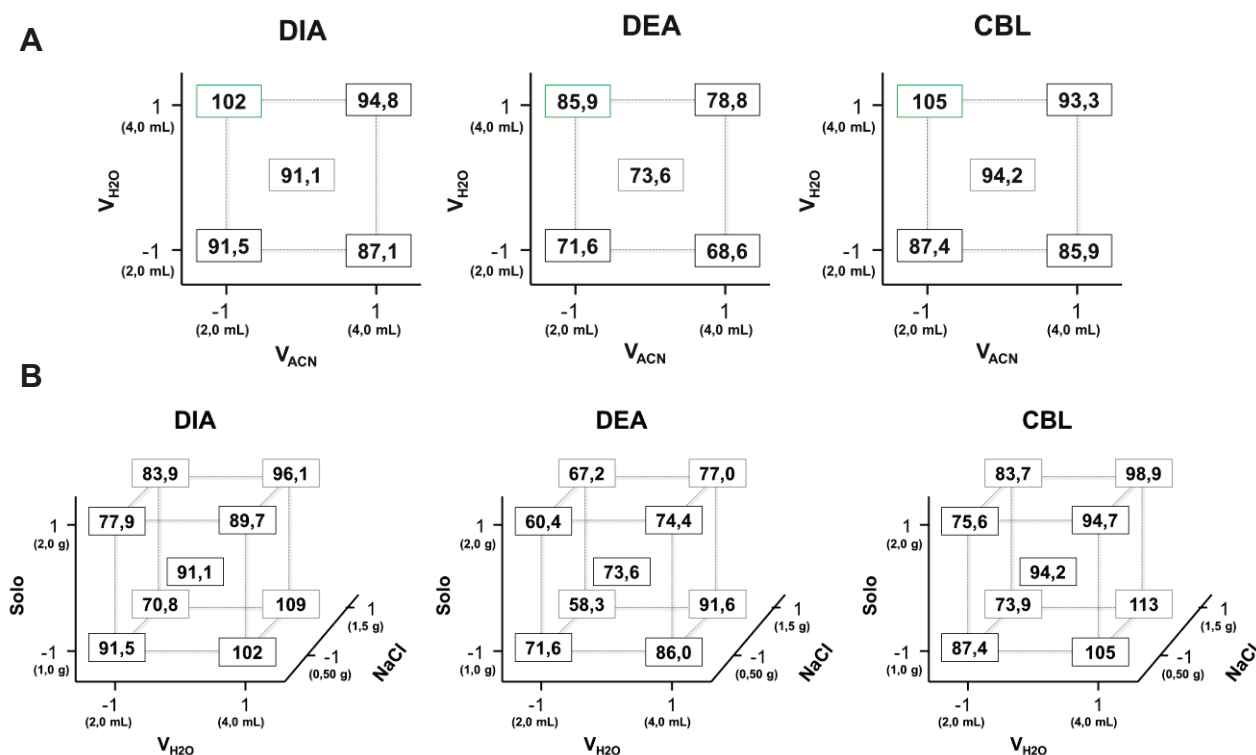


Um efeito positivo do volume de água foi observado para todos os analitos e isso implica que, passando do nível inferior deste fator (2 mL) para o nível superior (4 mL), houve um aumento no valor de recuperação dos agrotóxicos extraídos do solo. Este efeito foi particularmente importante para ATZ e DIU, para os quais este foi o único efeito estatisticamente significativo (Figura 3.5E e 3.5F, respectivamente).

A reidratação do solo é fundamental para extração dos agrotóxicos sorvidos no solo, pois, no caso dos agrotóxicos investigados, a forte interação dipolar entre os minerais e água exclui estes compostos orgânicos da fase mineral do solo, uma vez que existe a competição pelos sítios de sorção. Como a maioria das moléculas dos agrotóxicos apresenta caráter hidrofóbico (OLIVEIRA; REGITANO, 2009), são repelidas pela água, ficando mais disponíveis para extração com acetonitrila.

Os efeitos principais de volume de água e acetonitrila além da quantidade de solo foram significativos para DIA e DEA. No caso do CBL, todos os efeitos principais se apresentaram como significativos. Apesar disso, como alguns efeitos de interação também foram identificados como estatisticamente importantes para o sistema, a avaliação dos efeitos não pode mais levar em consideração apenas os efeitos principais. As interpretações geométricas dos efeitos de interação $V_{H_2O} \times V_{ACN}$ (mantendo a quantidade de solo e NaCl em 1,0 e 0,5 g, respectivamente) e Solo $\times V_{H_2O} \times NaCl$ (mantendo o volume de ACN em 2,0 mL) para estes analitos estão apresentadas na Figura 3.7.

FIGURA 3.7 – GRÁFICOS PARA INTERPRETAÇÃO GEOMÉTRICA DOS EFEITOS DE INTERAÇÃO DE A) SEGUNDA E B) TERCEIRA ORDEM DO PLANEJAMENTO 2^4 PARA DIA, DEA E CBL



O efeito de segunda ordem é melhor visualizado para DEA (Figura 3.7A): aumentando o volume de água de 2,0 para 4,0 mL, ocorre um aumento na recuperação de DEA quando o volume de ACN se encontra no nível inferior (2,0 mL). Para o mesmo aumento do volume de água no nível superior de ACN, observa-se um aumento na recuperação do metabólito, no entanto, menos pronunciado que no caso anterior. No caso de DIA e CBL, análise similar pode ser realizada sendo que ocorre um aumento da recuperação quando há um incremento no volume de água em ambos níveis de ACN, mas é mais pronunciado para o nível inferior. Dessa forma, apesar de todos os valores de recuperação se encontrarem na faixa adequada, a tendência de recuperação mais próxima a 100% convergiu para o ensaio usando 4,0 mL de água e 2,0 mL de ACN. Empregando esse volume de ACN, além de diminuir a diluição na proporção amostra:ACN, recomendada por Anastassiades et al. (2003) como sendo 1:1, diminui-se o uso de solvente orgânico na extração. Ainda, utilizando 4,0 mL de água não se observou a formação da emulsão relatada anteriormente, facilitando a retirada da fase superior.

As menores recuperações foram observadas no vértice de menor quantidade de solo, menor volume de água e maior quantidade de NaCl para os três analitos (Figura 3.7B), enquanto que a maior média de recuperação foi observada na face a direita de cada um dos cubos. Esses resultados confirmam a tendência de se obterem recuperações mais adequadas empregando maior volume de água. Em relação a quantidade de solo, valores de recuperações próximos a 100% foram conseguidos em todos os ensaios dessa face, exceto para DEA, para o qual é melhor a utilização de 1,0 g de solo.

Os resultados para CBD não apresentaram nenhum efeito significativo, mas seguiram a tendência observada para os demais analitos.

A fim de estabelecer um método de menor consumo de amostra e insumos, como ACN e NaCl, optou-se por empregar nos experimentos futuros as seguintes condições indicadas pelo planejamento: 1,0 g de solo, 4,0 mL de água, 2,0 mL de ACN e 0,50 g de NaCl (condição do ensaio 3).

Para melhorar a eficiência de um método analítico é comum se reduzir a quantidade de amostra desde que mantenha a representatividade e forneça resultados estatisticamente confiáveis (PSZCZOLIŃSKA; MICHEL, 2016). O método QuEChERS original propôs a utilização de 10 g de amostra. Esta condição foi adotada em muitos trabalhos (LESUEUR et al., 2008; LI et al., 2013; MANTZOS et al., 2013), mas a redução do tamanho de amostra para 5 g (DE CARLO et al., 2015; RASHID et al., 2010), 2,5 g (PINTO et al., 2010) e 1 g (MASIÁ et al., 2015) também são encontrados sem prejuízo na recuperação dos analitos.

Em relação aos demais fatores otimizados nessa etapa, também não há convergência da literatura para um determinado valor, sendo estudado caso a caso como pode ser observado nos trabalhos de revisão realizados por Bruzzoniti et al. (2014) e Pszczolińska e Michel (2016).

Para confirmar a recuperação dos analitos nessas condições, realizou-se um experimento empregando um nível de concentração diferente ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$; $n=3$). As recuperações aparentes médias obtidas foram de 81,9 a 111% com RSD inferiores a 5,5%, se mostrando a condição ideal para a etapa de extração.

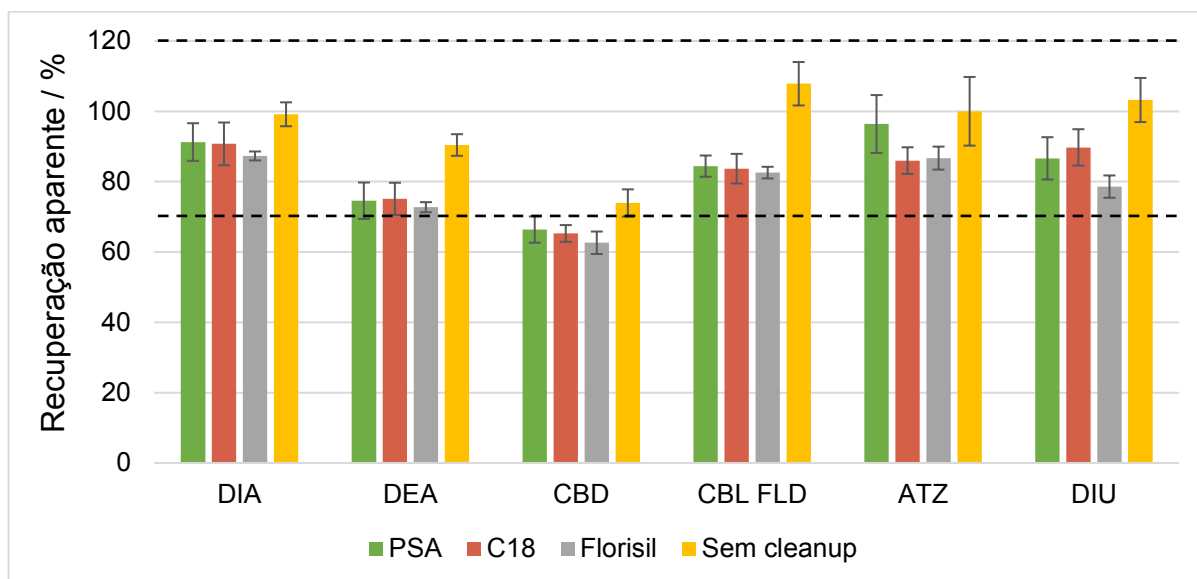
3.3.2.2 Otimização da etapa de *clean-up*

Apesar da acetonitrila possibilitar a extração dos analitos com uma menor quantidade de coextrativos lipofílicos (PRESTES et al., 2009), existe ainda a necessidade da etapa de limpeza para remoção de compostos provenientes da matriz que ainda possam interferir no método analítico. No caso de matrizes complexas como o solo, a realização dessa etapa promove ainda uma melhora na quantificação e na qualidade do sinal cromatográfico.

Entre os sorventes mais utilizados para remoção de interferentes em solo estão PSA e C18 (BRUZZONITI et al., 2014; MARTÍNEZ-LARA; PÁEZ MELO, 2017). Outro sorvente bastante empregado em outros métodos de preparo de amostra, como a extração em fase sólida, é o Florisil, sorvente hidrofílico geralmente utilizado para remoção de interferentes polares (ALBINET; TOMAZ; LESTREMAU, 2013; EPA, 2014). Ainda, muitos dos trabalhos relatados na literatura optam por não realizar a etapa de *clean-up* (CALDAS et al., 2011; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017). Segundo os autores, a principal justificativa para eliminar a etapa de *clean-up* é a obtenção de recuperações similares sem o uso de sorventes e aumento da frequência analítica. Entretanto, como mencionado anteriormente, a eliminação da etapa de *clean-up* descaracteriza o método QuEChERS. Além disso, o efeito dos sorventes é fortemente dependente das características do solo, dos analitos e da robustez do instrumento analítico (BRUZZONITI et al., 2014), devendo ser avaliada de forma criteriosa.

Para avaliar a etapa de *clean-up*, 50 mg de cada sorvente (PSA, C18 e Florisil) foram testadas em combinação com o sulfato de magnésio. Todos os ensaios foram comparados com o experimento realizado na ausência de fase sorvente (contendo apenas MgSO_4) e a influência de cada um na recuperação aparente dos analitos está mostrada na Figura 3.8.

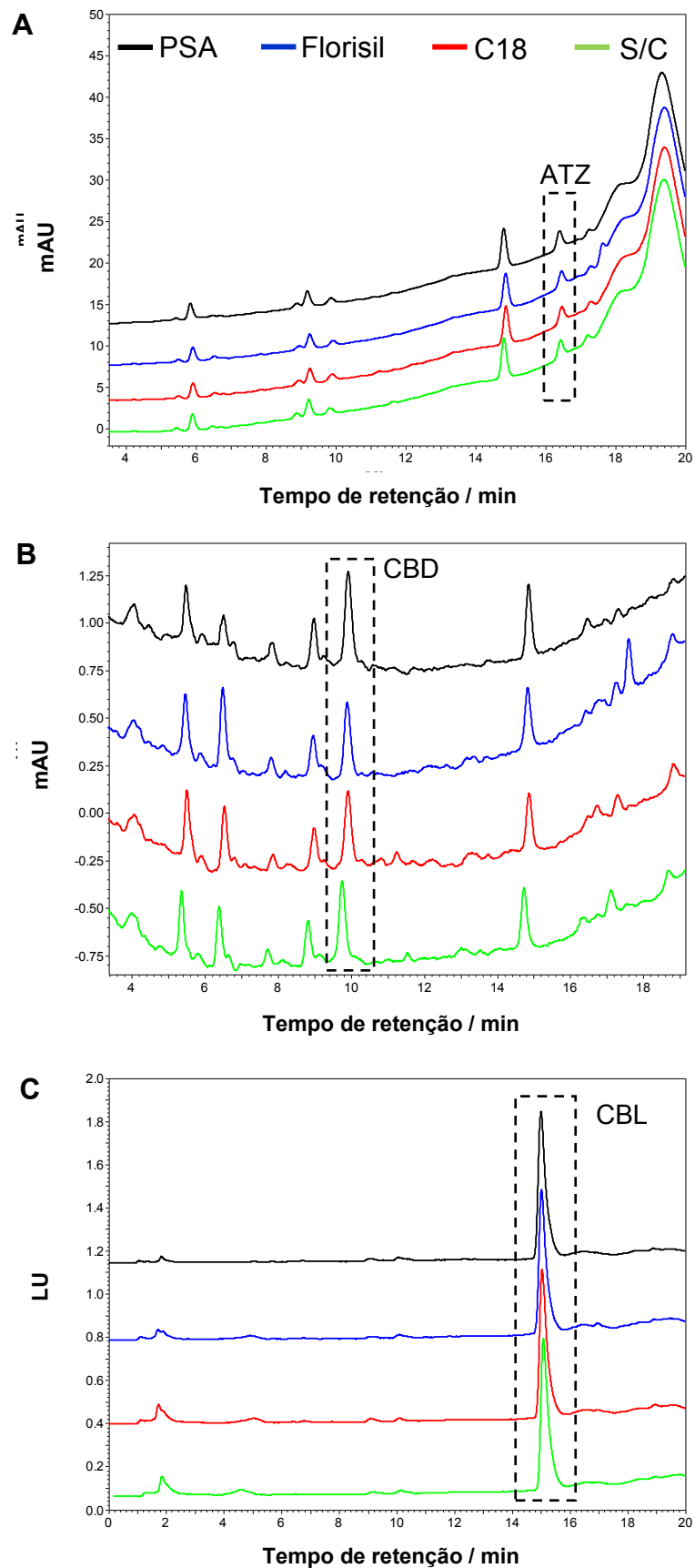
FIGURA 3.8 - RECUPERAÇÃO APARENTE DOS AGROTÓXICOS NA PRESENÇA DE DIFERENTES FASES SORVENTES (50 mg) NA ETAPA DE *CLEAN-UP* DO MÉTODO QuEChERS (n=3). (NÍVEL DE FORTIFICAÇÃO: 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$).



Maiores recuperações médias foram observadas para os experimentos realizados na ausência de fase sorvente, similar aos resultados obtidos em outros trabalhos (CALDAS et al., 2011; ŁOZOWICKA; RUTKOWSKA; JANKOWSKA, 2017; RIGI; FARAHBAKHS; REZAEI, 2015; SHI et al., 2010). Apesar disso, o teste F (95 % de confiança) não mostrou diferença significativa entre as variâncias dos resultados de cada sorvente comparado com o experimento sem *clean-up*.

O sinal cromatográfico foi diferente para cada sorvente empregado. Uma diminuição nos sinais referentes aos componentes do solo pode ser observada para os ensaios empregando PSA (Figura 3.9). Dado que o efeito de cada sorvente avaliado foi bastante próximo, optou-se pela utilização de PSA como fase sorvente por apresentar valores de recuperação aparente ligeiramente maiores para a maioria dos analitos. Martins et al. (2017) e Anastassiades et al. (2013) avaliaram a quantidade de coextrativos da matriz após a etapa de *clean-up* com e sem sorventes a partir de análise gravimétrica. Os resultados convergem para maiores quantidades de coextrativos na ausência de sorventes, o que pode levar a exposição do sistema cromatográfico a tais interferentes. Ainda, moléculas como aminoácidos, peptídeos, açúcares e substâncias húmicas estão dissolvidas na fase líquida do solo (SPARK; SWIFT, 2002), e a utilização de PSA para remoção deste tipo de coextrativos se justifica.

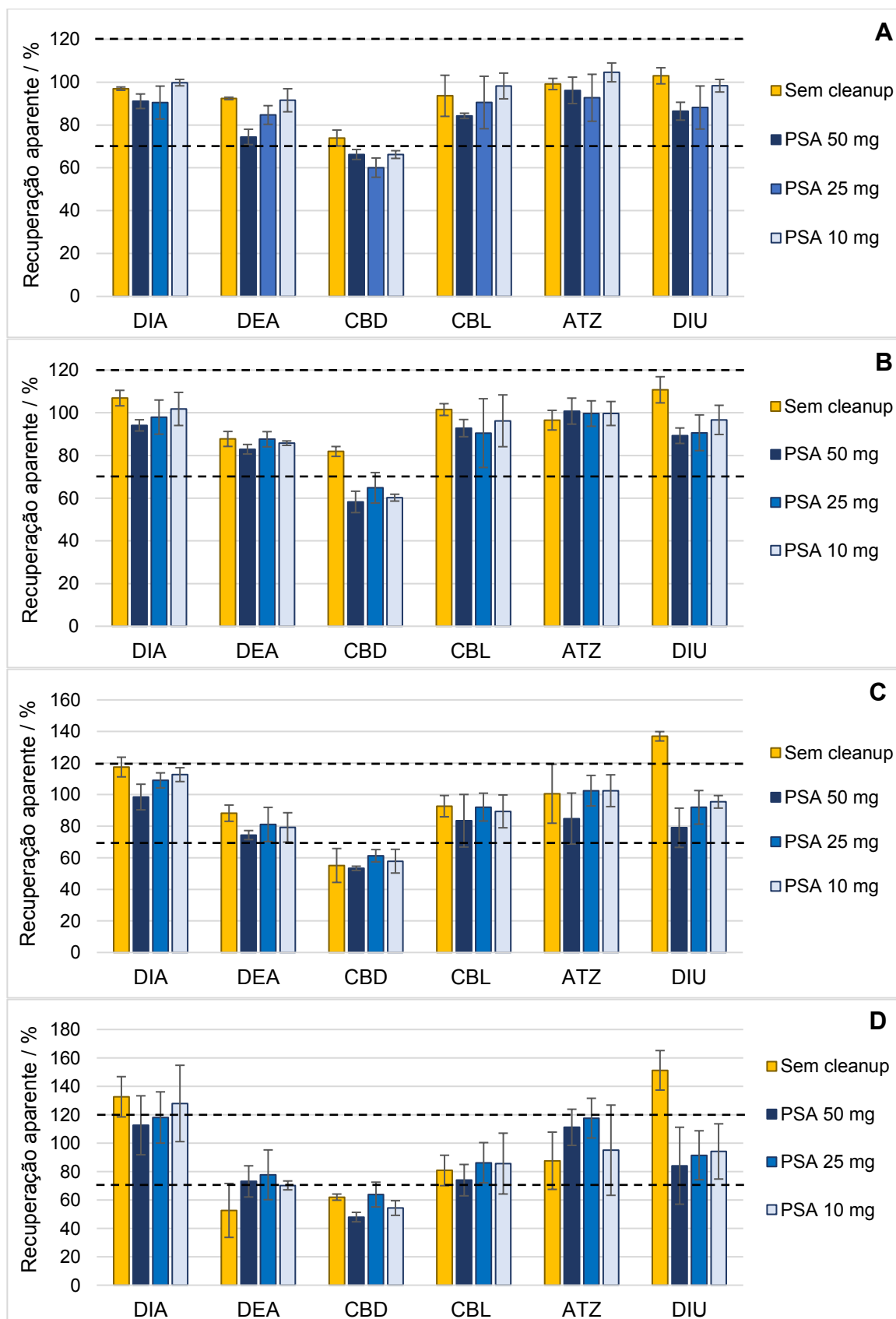
FIGURA 3.9 - COMPARAÇÃO DO SINAL CROMATOGRÁFICO EM A) 220 nm E B) 280 nm OBTIDO A PARTIR DO MÉTODO QuEChERS-LC-DAD/FLD NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DAS DIFERENTES FASES SORVENTES INVESTIGADAS. (S/C: SEM CLEAN-UP).



A fim de verificar uma avaliação da quantidade de PSA em função da diminuição da concentração dos analitos, diversos níveis de fortificação foram selecionados (200, 100, 50 e 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$), enquanto que as quantidades de PSA variaram entre 50, 25 e 10 mg. Ainda, experimentos seguindo os mesmos níveis de concentração, somente na presença de MgSO_4 , também foram realizados para comparação. Os resultados (Figura 3.10A) mostraram que para o maior nível de fortificação dos analitos (200 $\mu\text{g kg}^{-1}$) diferenças pouco significativas foram observadas, com recuperações entre 74,4 e 104% para todos os ensaios. A única exceção foi observada para o CBD, para qual na presença de PSA recuperações aparentes entre 60,1 e 66,2% foram obtidas, mas ainda com precisão adequada.

Conforme a concentração dos agrotóxicos fortificados em solo diminuiu, observaram-se duas situações distintas: um aumento nas taxas de recuperação aparente para DIA, ATZ e DIU, incluindo valores médios acima de 120%, e uma diminuição da mesma para DEA e CBD. No primeiro caso, tais resultados foram obtidos principalmente para os ensaios realizados na ausência de PSA, além de apresentarem altos valores de RSD. Este aumento na recuperação aparente e aumento na dispersão foi mais evidente para a concentração mais baixa avaliada (25 $\mu\text{g kg}^{-1}$, Figura 3.10D). O DIU foi o analito mais afetado pela ausência de sorvente com a diminuição da concentração, chegando a apresentar recuperações aparentes de até 151%. É provável que no caso dos analitos DIA, ATZ e DIU, algum coextrativo, que não foi removido na ausência de PSA, eluiu em tempos de retenção similares aos dos analitos, causando um aumento nas porcentagens de recuperação aparente.

FIGURA 3.10 - INFLUÊNCIA DA QUANTIDADE DE SORVENTE NA RECUPERAÇÃO APARENTE DOS ANALITOS EM DIFERENTES NÍVEIS DE CONCENTRAÇÕES: A) 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$, B) 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, C) 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ E D) 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$



Berlitz-Barbier et al. (2014) também apresentaram valores maiores de recuperação para a maioria dos analitos quando não utilizaram fases sorventes, mas ainda assim, para limitar a presença de interferentes na análise, empregaram PSA e carvão grafitizado para o *clean-up* de poluentes emergentes em sedimento (BERLITZ-BARBIER et al., 2014).

Já para os analitos que apresentaram menores taxas de recuperação (DEA e, principalmente, CBD), a matriz deve apresentar maior influência na extração. Para as menores concentrações de CBD investigadas (25 e 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$), a melhor recuperação foi conseguida empregando-se 25 mg de PSA (63,8 e 61,3%, respectivamente), enquanto que para as maiores concentrações, na ausência de fase sorvente (entre 73,9 e 81,9%). Entretanto, uma tendência foi observada entre as menores recuperações aparentes para esse analito, as quais foram obtidas na presença de 50 mg de PSA. Esta deve ser evitada principalmente pelo fato do CBD apresentar as menores taxas de recuperação.

Resultados similares foram observados para o DEA, sendo a condição com 50 mg de PSA a que proporcionou menor recuperação deste analito, com exceção da concentração mais baixa (25 $\mu\text{g kg}^{-1}$), para a qual o ensaio sem *clean-up* resultou em 52,6% de recuperação aparente.

Dankyi et al. (2014) também observaram uma influência negativa na recuperação de agrotóxicos de solo empregando PSA como fase sorvente no *clean-up* do método QuEChERS. Mantendo-se a mesma quantidade de PSA (25 mg) nos experimentos e variando a concentração em dois níveis, o efeito foi mais pronunciado foi encontrado quando a concentração dos analitos foi mantida próxima do LOQ do método proposto. Os autores atribuíram esse efeito ao aumento da influência da matriz em baixas concentrações dos analitos (DANKYI et al., 2014).

Martins et al. (2017) modificaram o método QuEChERS para determinação de agrotóxicos em alimentos e realizaram análise gravimétrica dos coextrativos removidos da matriz pelos sorventes avaliados (PSA, C18, sílica fluorada). Os autores observaram que a massa de coextrativos para o procedimento sem *clean-up* foi maior quando comparada com demais ensaios envolvendo diferentes fases sorventes (MARTINS et al., 2017).

Hou et al. (2014) também utilizaram a técnica gravimétrica para comparar a concentração de coextrativos após etapa de *clean-up* do QuEChERS para extração de agrotóxicos de chás, na ausência e presença de sorventes (PSA e nanotubos de

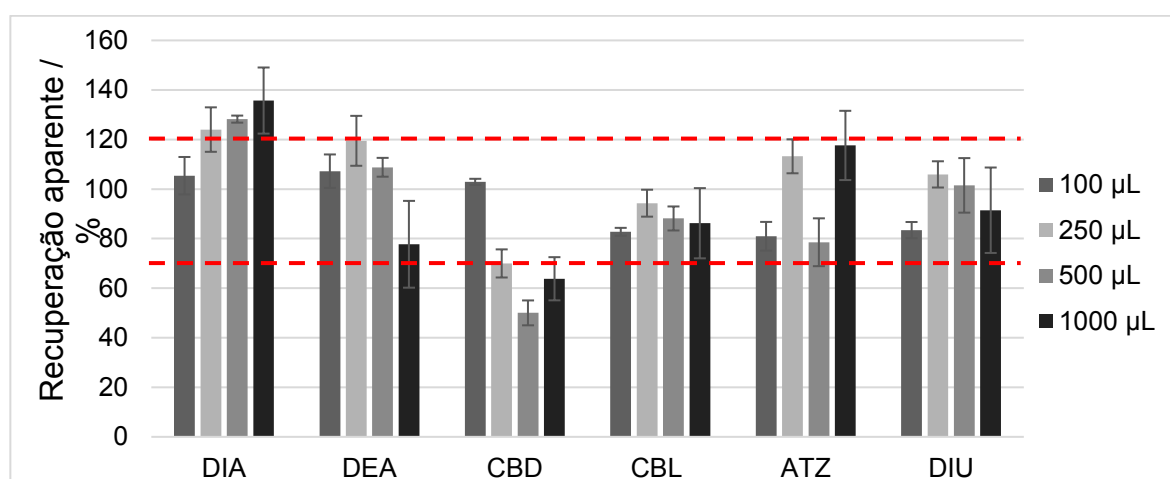
carbono). Aproximadamente 52 mg mL^{-1} foram determinados nos ensaios na ausência de fase sorvente, enquanto que empregando a PSA, este valor decresce cerca de 11% (HOU et al., 2014).

Até onde pôde ser investigado, não há relatos na literatura da influência da quantidade do sorvente em função da concentração dos analitos. Esses resultados são de grande relevância quando se leva em consideração que, durante a aplicação do método multirresíduo, as concentrações encontradas são até mesmo inferiores ao valor avaliado nesta etapa do estudo ($25 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$). Além disso, é importante destacar que mesmo com pequenas quantidades de sorvente empregadas (10 mg), o efeito sobre a recuperação dos analitos em termos de dispersão dos resultados foi significativa.

3.3.2.3 Estudo do volume de reconstituição

A fim de aumentar o sinal analítico obtido a partir do método de extração, avaliou-se a diminuição do volume de reconstituição do extrato a ser analisado no LC-DAD/FLD. Os volumes testados variaram entre 100 e 1000 μL e os resultados obtidos para recuperação dos analitos nesses ensaios está mostrado na Figura 3.11. Como a recuperação aparente para a condição empregando 25 mg de PSA e concentrações mais baixas dos analitos apresentou flutuações abaixo de 70% e acima de 120%, este ensaio foi conduzido no menor nível de fortificação estudado ($25 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$).

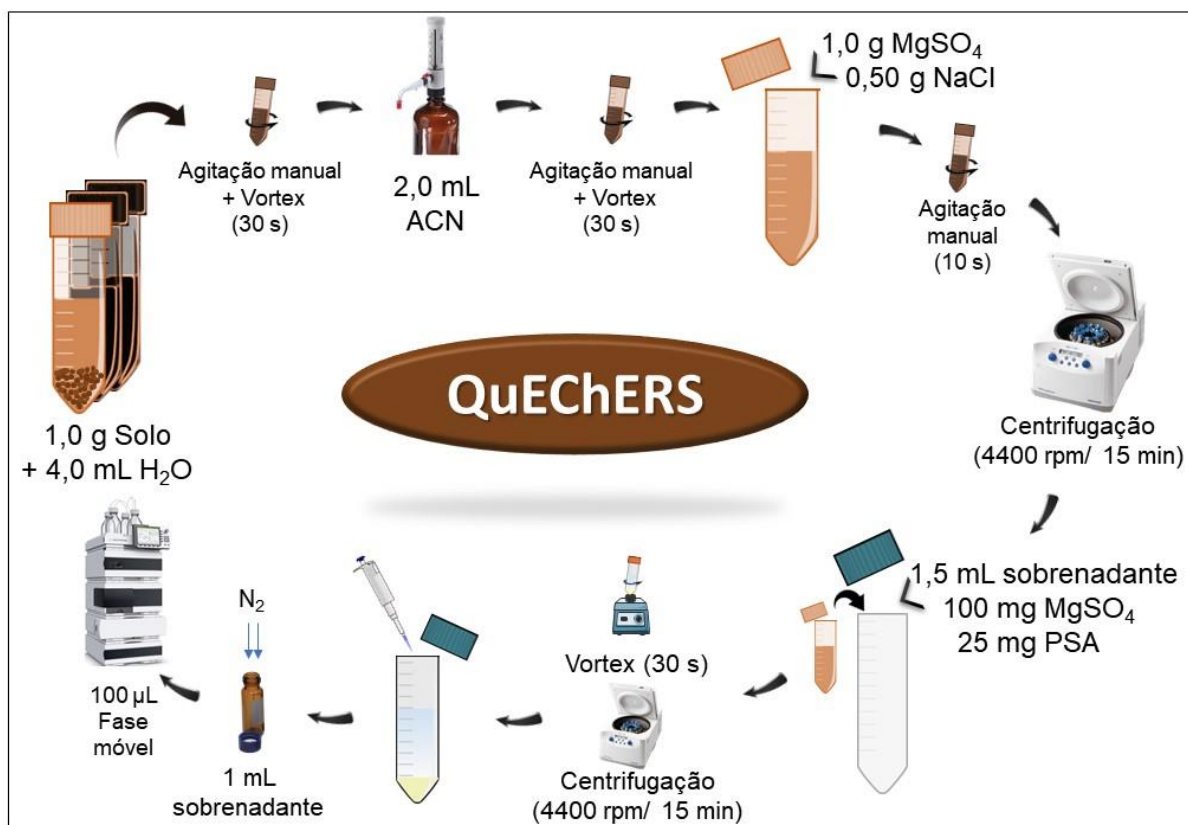
FIGURA 3.11 - OTIMIZAÇÃO DO VOLUME DE RECONSTITUIÇÃO EMPREGADO NO MÉTODO QuEChERS PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS DE SOLO. (NÍVEL DE FORTIFICAÇÃO: $25 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$; VOLUME DE ACN: 5,0 mL; N=3).



Como pode ser observado, as melhores respostas em relação a recuperação (entre 81,0 para ATZ a 107% para DEA) dos quatro agrotóxicos e dois metabólitos foi obtida empregando o volume de reconstituição de 100 μL . Ainda, nesta condição observou-se a menor dispersão dos resultados comparado com os demais volumes de reconstituição avaliados. Outro dado relevante da comparação entre os volumes de reconstituição é que para 1000 μL , o qual havia sido empregado durante toda a etapa de otimização, foram encontrados os maiores RSD (entre 9,83 e 22,5%) para todos os analitos. Provavelmente a variação observada nesse experimento reflete as demais observadas ao longo da investigação dos melhores parâmetros para extração e *clean-up* e não pode ser negligenciada.

Com base nos resultados de otimização do método apresentado, as condições ótimas para extração de agrotóxicos de solo utilizando QuEChERS modificado como método de preparo de amostra seguiram o procedimento mostrado na Figura 3.12.

FIGURA 3.12 - FLUXOGRAMA DO MÉTODO QuEChERS OTIMIZADO PARA EXTRAÇÃO DE AGROTÓXICOS E METABÓLITOS DE SOLO

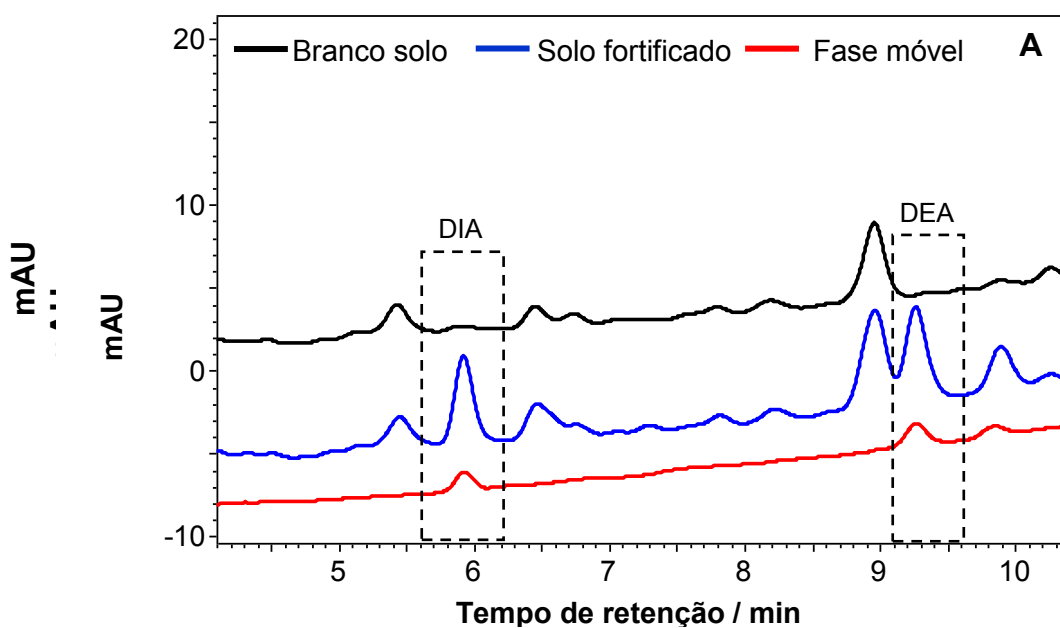


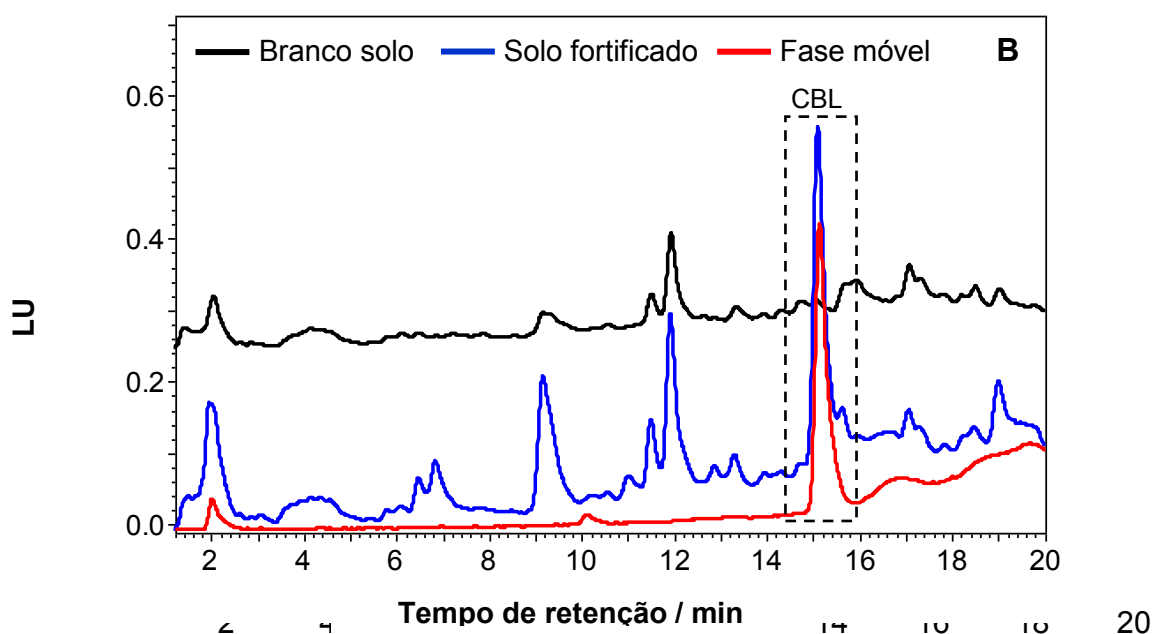
3.3.4 Validação do método

3.3.4.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela análise de amostras de solo na ausência de analitos, extraídas pelo método QuEChERS otimizado. Nenhum outro pico significativo, com base no sinal/ruído, foi observado nos tempos de retenção dos compostos de interesse. Os cromatogramas típicos dos extratos com e sem fortificação são mostrados na Figura 3.13.

FIGURA 3.13 - CROMATOGRAMAS TÍPICOS OBTIDOS PARA EXTRATO DE SOLO COM E SEM FORTIFICAÇÃO E SINAL DOS ANALITOS EM SOLVENTE (CONCENTRAÇÃO: $50 \mu\text{g L}^{-1}$) EM A) 215 nm E B) FLD (λ_{EX} : 280 nm; λ_{EM} : 330 nm). NÍVEL DE FORTIFICAÇÃO EM SOLO DE 50 E $15 \mu\text{g kg}^{-1}$, RESPECTIVAMENTE

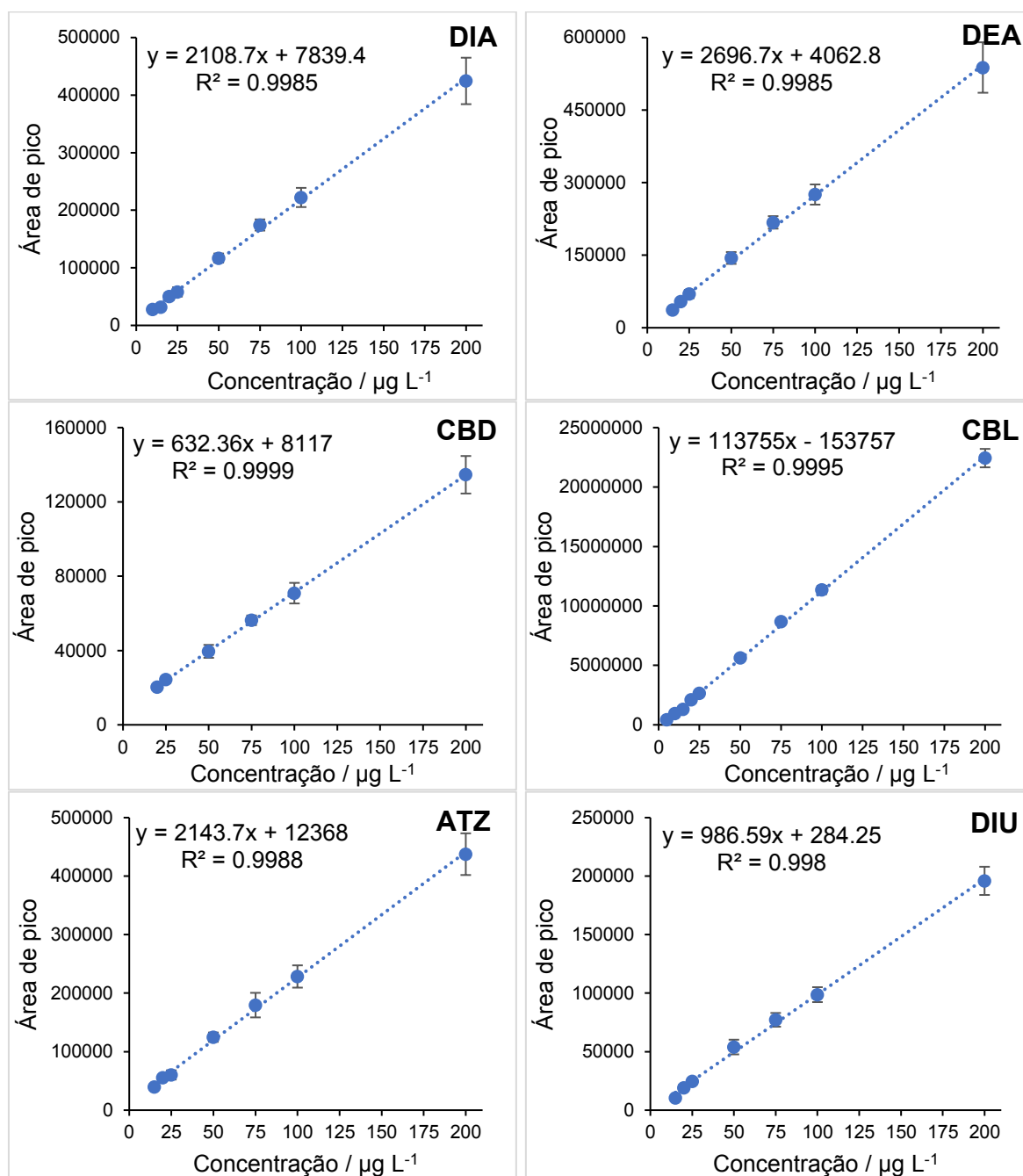




3.3.4.2 Linearidade

Para compensar qualquer efeito dos componentes da matriz, as curvas analíticas foram construídas diretamente em solo. As amostras de solo foram inicialmente fortificadas na faixa de 1,0 a 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ e submetidas ao processo de extração QuEChERS otimizado de acordo com o fluxograma da Figura 3.12. A correlação entre as áreas de pico e as concentrações dos agrotóxicos foi linear dentro da faixa estudada (Figura 3.14). Os valores de coeficiente de correlação variaram de 0,9980 para DIU até 0,9999 para CBD.

FIGURA 3.14 - CURVAS ANALÍTICAS DOS AGROTÓXICOS E METABÓLITOS CONSTRUÍDAS NA MATRIZ EMPREGANDO O MÉTODO QuEChERS-LC-DAD/FLD



Segundo o método dos mínimos quadrados ordinários aplicado para a construção das curvas analíticas, além da avaliação do coeficiente de correlação, os resíduos gerados após a regressão devem ser avaliados quanto a homoscedasticidade (gráfico de dispersão e teste F) e independência (teste de Durbin-Watson).

O teste F para avaliar a homoscedasticidade dos resíduos, realizado entre as variâncias de cada concentração (Tabela 3.7), mostrou que os resíduos obtidos estão distribuídos de forma homogênea na faixa linear da curva analítica para todos os analitos estudados, confirmando a aleatoriedade dos resíduos observados nos gráficos de dispersão.

No caso da independência dos resíduos, a avaliação pelo teste de Durbin-Watson (Tabela 3.7) mostrou que não houve interferências e/ou correlações entre os resíduos, uma vez que os valores obtidos para o referido teste foram superiores ao limite superior (d_U) tabelado para todos os analitos.

Apenas dois valores de teste F estavam acima do $F_{\text{crítico}}$ (valores destacados na Tabela 3.7). entretanto, como eles se mostraram independentes segundo Durbin-Watson, manter esses pontos não acarretava em prejuízo na dispersão dos resíduos. Ainda, como as curvas foram realizadas em dias diferentes, a avaliação da linearidade e dos resíduos salientada acima é mais fidedigna da rotina analítica empregadas nos laboratórios de pesquisa.

TABELA 3.7 - RESULTADOS DOS TESTES DE PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DA LINEARIDADE E CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA PARA AMOSTRAS DE SOLO ($n = 6$)

Analito	FCL* / $\mu\text{g kg}^{-1}$	Teste F**	Teste D-W [#]	LOQ / $\mu\text{g kg}^{-1}$
		F_{calc}	d_{calc}	
DIA	10 – 200	$F_{1,2}=1,1$; $F_{2,3}=3,1$; $F_{3,4}=1,7$; $F_{4,5}=1,0$; $F_{5,6}=1,5$; $F_{6,7}=3,0$; $F_{6,7}=5,9$	2,34	10,0
DEA	15 – 100	$F_{1,2}=1,3$; $F_{2,3}=5,4$; $F_{3,4}=2,1$; $F_{4,5}=1,1$; $F_{5,6}=2,6$; $F_{6,7}=6,2$	2,47	15,0
CBD	20 – 100	$F_{1,2}=2,8$; $F_{2,3}=3,7$; $F_{3,4}=1,8$; $F_{4,5}=4,6$; $F_{6,7}=3,3$	2,75	20,0
CBL	5 – 200	$F_{1,2}=7,1$; $F_{2,3}=3,7$; $F_{3,4}=1,6$; $F_{4,5}=2,6$; $F_{5,6}=1,9$; $F_{6,7}=3,1$; $F_{7,8}=4,8$; $F_{8,9}=5,2$	2,53	5,00
ATZ	15 – 200	$F_{1,2}=1,8$; $F_{2,3}=7,2$; $F_{3,4}=1,0$; $F_{4,5}=7,0$; $F_{5,6}=1,2$; $F_{6,7}=3,5$	1,75	15,0
DIU	15 – 200	$F_{1,2}=5,6$; $F_{2,3}=3,2$; $F_{3,4}=18,3$; $F_{4,5}=1,1$; $F_{5,6}=1,2$; $F_{6,7}=3,4$	2,10	15,0

*FCL: Faixa de concentração linear; **Valor crítico $F_{5,5,95\%}=7,15$ (bicaudal);

[#]Teste D-W: teste Durbin-Watson; $d_{\text{crítico}}$: $d_L=1,35$; $d_U=1,45$ para DIA, DEA, ATZ e DIU; $d_L=1,25$; $d_U=1,38$ para CBD e $d_L=1,42$; $d_U=1,5$ para CBL.

O limite de quantificação (LOQ) correspondeu ao menor nível da curva analítica, sendo a menor concentração possível de detectar com exatidão (70 – 120%) e precisão ($RSD \leq 20\%$) adequados (SANCO, 2010). Os valores de LOQ considerados são apresentados na Tabela 3.7.

O LOQ obtido para atrazina por De Carlo et al. (2015) foi de $14 \mu\text{g kg}^{-1}$, muito similar ao obtido no presente trabalho. Após a otimização das condições do QuEChERS, as determinações dos analitos ocorreram em um sistema LC-UV. Este sistema é considerado análogo ao LC-DAD empregado.

A partir do uso de sistemas LC-MS/MS, outros trabalhos na literatura apresentam valores de LOQ da ordem de décimos de $\mu\text{g kg}^{-1}$ (GERÓNIMO et al., 2015; HOMAZAVA et al., 2014; MASIÁ et al., 2015). Por exemplo, os LOQ para ATZ nos dois trabalhos mencionados foram de 0,4 e $2,6 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. Em relação ao DIU, o LOQ obtido por Masiá et al., empregando as condições instrumentais já salientadas, foi de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, valor bem próximo ao obtido quando analisado por LC-DAD com o método QuEChERS otimizado ($15 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Lesueur et al. (2008) também desenvolveram um método QuEChERS para determinação de ATZ, DIA, DEA (determinados por GC-MS) e CBD e DIU (determinados por LC-MS/MS) em solo. Com exceção do CBD, os LOQ obtidos pelos autores foram de 2,6 a 3,8 vezes superior aos mostrados na Tabela 3.7, reafirmando a necessidade do estabelecimento de um bom preparo de amostra.

No caso do CBL, a detecção realizada por fluorescência permitiu o menor LOQ ($5,0 \mu\text{g kg}^{-1}$) dentre os agrotóxicos investigados. Asensio-Ramos et al. (2011) obtiveram LOQ de mesma ordem de grandeza entre 2,09 e $2,47 \mu\text{g kg}^{-1}$ para o carbaril empregando mesmo sistema de detecção por LC-FLD e extração por DLLME com líquido iônico.

Apesar de ser possível a quantificação de menores concentrações dos agrotóxicos pelo uso de técnicas mais sensíveis, os valores de LOQ obtidos foram considerados satisfatórios.

Vale lembrar ainda que, infelizmente, não existem limites máximos de resíduos desses agrotóxicos em solo estipulados pela legislação brasileira para serem usados como alvo de um método analítico. Ainda, mesmo com todos os processos físicoquímicos que o agrotóxico está sujeito após a aplicação, sua concentração residual oferece riscos à saúde humana, devendo ser monitorada.

3.3.4.3 Exatidão e Precisão

Um método analítico confiável deve ser capaz de prover resultados aceitáveis de exatidão e precisão. Segundo as recomendações da SANTE/11945/2015 e SANCO/825/00, recuperações são aceitáveis dentro da faixa de 70 a 120% com RSD $\leq 20\%$, mas em certos casos, recuperações abaixo de 70% podem ser observadas desde que a precisão seja mantida.

Os resultados apresentados na Tabela 3.8 indicam que porcentagens adequadas de recuperação foram obtidas para todos os analitos, inclusive nas fortificações no nível do LOQ (de 74,67% para CBD a 108% para CBL) para ensaios realizados em um mesmo dia. Os valores de RSD dessas análises também se mostraram adequados (até 19,8%).

TABELA 3.8 - RESULTADOS PARA RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS EMPREGANDO O MÉTODO QuEChERS-LC-DAD/FLD EM SOLOS (n=5)

Analito	Nível de fortificação	R ^a / %	Repetitividade / %	R ^b / %	Precisão intermediária / %
DIA	LOQ*	87	19,8	100	12,4
	10xLOQ [#]	92	12,5	88	9,7
DEA	LOQ	98	9,6	91	14,9
	10xLOQ	93	7,3	97	6,5
CBD	LOQ	75	13,9	89	20,2
	10xLOQ	92	2,6	98	11,9
CBL	LOQ	108	4,0	109	5,5
	10xLOQ	86	12,8	89	9,6
ATZ	LOQ	91	16,5	91	19,6
	10xLOQ	107	10,7	105	11,8
DIU	LOQ	84	13,3	86	13,1
	10xLOQ	98	4,6	102	5,8

*LOQ: DIA: 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$; DEA: 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$; CBD: 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$; CBL: 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$; ATZ: 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$; DIU: 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$

[#]10xLOQ: DIA: 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$; DEA: 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$; CBD: 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$; CBL: 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$; ATZ: 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$; DIU: 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$

^a: média das recuperações obtidas para ensaios realizados no mesmo dia;

^b: média das recuperações obtidas para ensaios realizados em dias diferentes.

Avaliando as propriedades físicoquímicas do CBD, é provável que a menor recuperação apresentada por esse agrotóxico se deva a sua baixa solubilidade em água (8,0 mg L^{-1}), tendendo a particionar em maior proporção na fração orgânica do solo (OLIVEIRA E REGITANO, 2009). O máximo de sorção do CBD na matéria orgânica do solo ocorre, teoricamente, próximo ao seu valor de pKa (4,2) (BERGLÖF

et al., 2002), corroborando com a menor porcentagem de recuperação desse analito. Furini et al. (2016) também sugeriram que a abundância relativa de CBD é dependente do pH, sendo a predominância da molécula neutra entre os seus dois valores de pKa ($pK_{a1} = 4,5$, referente ao grupo imidazólico, e $pK_{a2} = 10,6$, relacionado com a amina alifática). Ainda, Berglöf et al. (2002), em estudos de sorção do CBD em solo vietnamitas, sugeriram que este analito possui maior tendência em ficar adsorvido nos solos com maiores quantidades de matéria orgânica e argila. Ainda, os autores apontaram para um possível comportamento sortivo irreversível. Nemeth-Konda et al. (2002) também observaram comportamento sortivo similar, com quantidades não desorvidas elevadas para CBD (NEMETH-KONDA et al., 2002). Os solos estudados nos dois casos apresentaram teores de argila de 49,8% e 1,16% e matéria orgânica de 15,4% e 9,8%, respectivamente. Comparando com as características do solo utilizado neste trabalho, o teor de argila (75%) é bastante superior e a matéria orgânica (3,7%) encontra-se em um valor intermediário, mostrando que é provável que o comportamento do CBD seja similar ao observado nos trabalhos salientados. Para os demais analitos, como se encontram predominantemente na sua forma neutra, uma sorção provavelmente reversível ocorreu na superfície dos argilominerais e matéria orgânica, através de interações não-específicas como partição hidrofóbica e ligações de hidrogênio (OLIVEIRA; REGITANO, 2009), o que refletiu em taxas adequadas de recuperação.

Para a precisão intermediária, os ensaios foram realizados em dias diferentes nos mesmos níveis de fortificação da repetibilidade (Tabela 3.8). Os valores obtidos para o menor nível de fortificação variaram de 5,55 % para o CBL até 20,2 para CBD enquanto que para o maior nível entre 5,81% para DIU e 11,9% para CBD. As recuperações obtidas nessa situação, também se mostraram adequadas nos níveis de fortificação avaliados (entre 86,07 e 108,6%).

A precisão de um método é dependente da matriz da amostra, da concentração dos analitos e da técnica de análise. Como a influência da matriz no menor nível de fortificação é maior, esperava-se maiores dispersões nos resultados relacionados com a recuperação dos analitos do solo. Os resultados observados estão de acordo com o esperado tanto para repetibilidade quanto para precisão intermediária.

3.3.4.4 Robustez

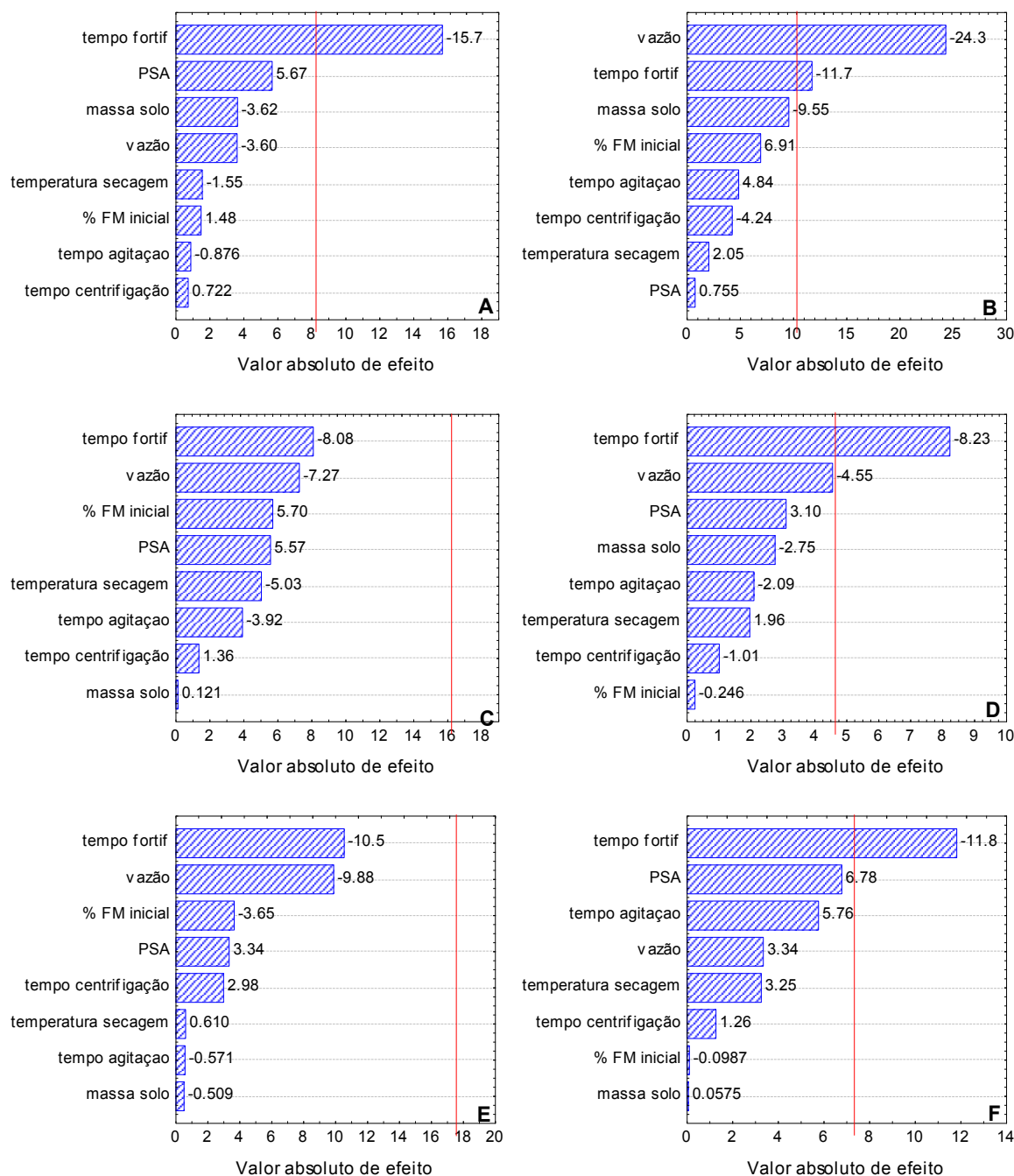
A avaliação da robustez do sistema é de extrema importância principalmente quando amostras de elevada complexidade, tais como o solo, são analisadas. A maioria dos trabalhos que envolvem QuEChERS em amostras de solo, validam a robustez através da aplicação do método em amostras de solo de constituição diferente da utilizada durante a otimização (HOMAZAVA et al., 2014; RASHID et al., 2010). Até onde se pôde investigar, não há trabalhos na literatura que envolvam o uso de planejamento fatorial para estudar a robustez do método QuEChERS em solo.

Com base nisso, a robustez foi estimada empregando um planejamento fracionário Plackett-Burman avaliando os fatores e níveis expostos na Tabela 3.3. Os efeitos principais calculados em termos de valor absoluto são mostrados através dos gráficos de Pareto apresentados na Figura 3.15.

As variações introduzidas no método não tiveram nenhuma influência para CBD e ATZ. Isso significa que o método pode ser considerado bastante robusto para determinação desses analitos em solo, o que é particularmente importante no caso do CBD que apresenta maior tendência em ficar sorvido e apresentou as menores porcentagens de recuperação.

Para os demais analitos o efeito do tempo de fortificação (contato dos analitos com o solo) foi estatisticamente significativo, sendo que um aumento no tempo de interação dos analitos com o solo, influência de forma negativa na recuperação.

FIGURA 3.15 - GRÁFICOS DE PARETO EM TERMOS DE VALORES ABSOLUTOS DE EFEITO PARA O PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN USADO PARA AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ PARA A) DIA, B) DEA, C) CBD, D) CBL, E) ATZ E F) DIU. O NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA PARA CADA ANALITO É REPRESENTADO PELA LINHA VERMELHA



Esse efeito já era esperado pois os processos de interação dos agrotóxicos no solo passam por diferentes estágios de resposta. Em um primeiro estágio, propõe-se que o analito difunde de forma rápida na superfície do solo, levando de minutos a horas. Após esse período, o estágio de equilíbrio é atingido de forma mais lenta,

chegando ao processo denominado de envelhecimento (em semanas), no qual o agrotóxico pode ficar retido de forma irreversível (OLIVEIRA; BRIGHENTI, 2011). Dessa forma, como o tipo de interação dos analitos com o solo se altera ao longo do tempo, era de se esperar que este fosse um fator relevante para a robustez do método. Levando em conta que os processos sortivos nas primeiras etapas ocorrem de forma reversível e que os mecanismos de interação podem ocorrer instantaneamente após o contato do agrotóxico com as superfícies ativas da matriz (OLIVEIRA; REGITANO, 2009), o tempo de contato de 1h foi considerado adequado. Além disso, as recuperações obtidas no ensaio de robustez se mantiveram dentro da faixa aceitável para a maioria dos ensaios realizados.

A única exceção foi observada para DEA (Figura 3.15B), no qual a mudança na vazão do método cromatográfico também foi significativa. A menor recuperação obtida nesse caso (63,80% empregando vazão de $0,62 \text{ mL min}^{-1}$) se deve a coeluição com um interferente da matriz (Figura 3.11) que, nas condições otimizadas anteriormente empregando a vazão de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$, era separado com resolução adequada.

As alterações investigadas para os demais fatores avaliados no ensaio de robustez não apresentaram efeitos principais significativos sobre o método desenvolvido.

Os resultados apresentados para robustez se mostraram condizentes com o restante dos ensaios de validação. Portanto, o método desenvolvido para a determinação de ATZ e seus metabólitos (DIA e DEA), CBD, CBL e DIU empregando QuEChERS e LC-DAD/FLD pode ser considerado seletivo a esses analitos, com exatidão e precisão adequados para a determinação de forma robusta de concentrações a partir de $5,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ em amostras de solo.

3.3.5 Aplicação do método

A fim de demonstrar a sua aplicabilidade, as condições do método QuEChERS otimizadas e validadas foram empregadas na determinação dos agrotóxicos e metabólitos da ATZ em solos coletados em região com histórico de agricultura intensiva de soja e milho. No Paraná, grande parte da extensão territorial é ocupada pelas atividades agrícolas, sendo que lavouras e pastagens ocupam 83,0% do solo paranaense (IPARDES, 2017). No caso da região amostrada, esse valor de

ocupação do solo para agricultura chega a mais de 61%. A aplicação de agrotóxicos tem crescido nos últimos anos no Estado e a quantidade média aplicada em 2015 foi de 8,25 kg/ha/ano. Na região delimitada pela Bacia Hidrográfica Paraná 3, mais de 6 milhões kg L⁻¹ de herbicidas foram aplicados (IPARDES, 2017). Diante do aumento desenfreado do consumo de agrotóxicos, a aplicação do método para detectar e quantificar esses analitos em solo se faz imperativa.

Com base nesses antecedentes, as campanhas amostrais foram realizadas no período de seis semanas entre setembro e outubro de 2017, no município de Toledo (Paraná). Cada amostra foi analisada sem e com fortificação nos níveis do LOQ e 10xLOQ (n=5). Do total de amostras analisadas, nenhum resíduo dos agrotóxicos estudados foi quantificado empregando o método QuEChERS-LC-DAD/FLD (Tabela 3.9).

TABELA 3.9 - RECUPERAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DOS AGROTÓXICOS E METABÓLITOS DA ATZ EM AMOSTRAS REAIS DE SOLO EMPREGANDO O MÉTODO QuEChERS-LC-DAD/FLD EM SOLOS (n=5)

Analito	Nível	Recuperação (RSD) / %					
		ST7	ST8	ST9	ST10	ST11	ST12
DIA	LOQ*	64 (11)	77(12)	80 (8)	87 (8)	85 (22)	82 (26)
	10xLOQ#	67 (11)	99 (7)	87 (8)	87 (10)	82 (8)	104 (4)
DEA	LOQ	120 (13)	98 (21)	113 (8)	104 (6)	100 (21)	95 (14)
	10xLOQ	69 (9)	100 (6)	91 (7)	90 (12)	99 (10)	109 (4)
CBD	LOQ	61 (3)	73 (16)	80 (11)	102 (12)	68 (21)	68 (18)
	10xLOQ	81 (13)	106 (6)	108 (6)	107 (10)	113 (10)	121 (5)
CBL	LOQ	99 (3)	113 (6)	111 (10)	117 (24)	96 (6)	97 (27)
	10xLOQ	66 (16)	95 (15)	95 (6)	81 (27)	82 (9)	99 (4)
ATZ	LOQ	72 (8)	67 (17)	99 (21)	112 (28)	105 (37)	106 (25)
	10xLOQ	75 (16)	99 (7)	87 (2)	97 (7)	110 (10)	107 (5)
DIU	LOQ	97 (5)	119 (8)	112 (6)	122 (13)	119 (27)	111 (11)
	10xLOQ	78 (11)	107 (5)	100 (2)	91 (13)	94 (12)	116 (4)

*LOQ: DIA: 10 µg kg⁻¹; DEA: 15 µg kg⁻¹; CBD: 20 µg kg⁻¹; CBL: 5 µg kg⁻¹; ATZ: 15 µg kg⁻¹; DIU: 15 µg kg⁻¹

#10xLOQ: DIA: 100 µg kg⁻¹; DEA: 150 µg kg⁻¹; CBD: 200 µg kg⁻¹; CBL: 50 µg kg⁻¹; ATZ: 150 µg kg⁻¹; DIU: 150 µg kg⁻¹

Recuperações entre 61 para CBD a 122% para DIU foram obtidas, entretanto, com alguns valores para o RSD superiores a 20%. Considerando que o solo selecionado para aplicação do método, apesar de similar, não possui as mesmas características físico-químicas, considerou-se esses valores aceitáveis. Ainda, as

partículas minerais e orgânicas do solo interagem entre si, formando agregados que variam o arranjo espacial dos grupos disponíveis para interação, bem como, a liberação de outros compostos presentes no solo (OLIVEIRA; BRIGHENTI, 2011). Oliveira e Brighenti (2001) salientaram ainda que, no geral, latossolos apresentam menor atividade da fração argila, enquanto que nitossolos mostram característica intermediária. Nesse caso, sugere-se que as diferenças nas interações dos analitos com a porção de nitossolo e latossolo levam a certas discrepâncias nas recuperações obtidas, especialmente para ATZ. Spark e Swift (2002) avaliaram o efeito da composição do solo e teor de matéria orgânica para a sorção de agrotóxicos, entre eles a atrazina. Os autores concluíram que a sorção foi governada pela fração disponível dos minerais de argila, enquanto que a matéria orgânica apresentou um efeito negligenciável (SPARK; SWIFT, 2002).

Apenas na amostra ST12, a atrazina pôde ser quantificada com concentração de $15,7 \mu\text{g kg}^{-1}$. Esta concentração é bastante próxima do LOQ ($15 \mu\text{g kg}^{-1}$). Apesar da similaridade espectral fornecer uma probabilidade elevada para ATZ (99%), o sinal do DAD para este tempo de retenção (16,4 min) não pode ser atribuído diretamente a este analito, podendo, entretanto, estar relacionado a algum coextrativo que apresenta tempo de retenção similar ao da ATZ. É importante destacar que o solo empregado como amostra real passou por atividade agrícola recente (preparação do solo para plantio) sendo que, a aplicação de diversas substâncias nesta etapa ter influenciado na eluição da ATZ.

Com base nessas considerações e nos valores obtidos para a recuperação dos analitos em amostras reais, o método QuEChERS-LC-DAD/FLD desenvolvido apresentou uma boa performance analítica para a determinação de agrotóxicos em solo.

3.4 CONCLUSÕES

O método QuEChERS foi modificado e validado para a extração de atrazina e seus metabólitos, DIA e DEA, carbendazim, carbaril e diuron de amostras de solo. A metodologia analítica empregada forneceu um procedimento de preparo de amostra simples e rápido, se comparado com outras técnicas empregadas no âmbito de extração de compostos de solo.

O método de extração otimizado por meio do planejamento fatorial 2^4 contou com a minimização da quantidade de amostra (1,0 g) e solventes (2,0 mL de ACN) empregados na extração e também atendem os princípios atuais de menor consumo de reagentes e geração de resíduos. Além disso, o emprego do planejamento fatorial nessa etapa se mostrou crucial para a obtenção de recuperações mais adequadas dos agrotóxicos analisados, além de verificar o efeito das interações das variáveis.

A investigação da influência da quantidade do sorvente em função da concentração dos analitos auxiliou na escolha da melhor quantidade de PSA sem prejuízo na resposta dos analitos.

O bom desempenho analítico do método proposto foi demonstrado pelo atendimento aos critérios de validação segundo as figuras de mérito de seletividade, linearidade ($R^2 \geq 0,998$), limite de quantificação (5,0 a 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$), recuperação (74,7% a 108%), precisão ($> 20\%$) e robustez. O método foi aplicado com sucesso na análise de amostras reais de solo na faixa de $\mu\text{g kg}^{-1}$, mostrando-se novamente adequado para a determinação dos analitos em solo.

Considerando que o método otimizado envolveu QuEChERS e LC-DAD/FLD, a incompatibilidade entre a determinação de resíduos de agrotóxicos e matrizes complexas foi superada empregando tal associação, demonstrando ser uma alternativa aos detectores de massa, nem sempre disponíveis nos laboratórios. A principal desvantagem deste tipo de detecção empregada está relacionada a sua baixa seletividade.

4 CONCLUSÃO GERAL

O método QuEChERS aplicado a matrizes ambientais apresenta algumas vantagens em relação aos métodos clássicos mais amplamente empregados para determinação de analitos em concentração traço: a extração dos analitos é executada de maneira rápida com fácil execução; flexível e adaptável a diversos tipos de matrizes; 18 amostras são preparadas entre 50 a 60 min sendo que a extração em fase sólida dispersiva permite o *clean-up* eficiente com pequenas quantidades de sorvente; pode ser considerado seguro pois não usa solventes clorados e com otimização, menores volumes de acetonitrila podem ser utilizados; a acetonitrila pode conter solventes modificadores para alcançar a polaridade adequada para extração; mantém as características do método como exatidão e precisão frente a pequenas alterações experimentais; pode ser considerado eficiente na extração de analitos na concentração de traços salvo que a relação entre o analito e a matriz seja investigado e as variáveis do método otimizadas para este fim.

A associação do QuEChERS com detecção e quantificação por LC-DAD se mostrou uma alternativa mais acessível, simples, rápida e barata para o estabelecimento de análises ambientais de rotina quando comparada com métodos usualmente adotados para o controle de contaminantes de preocupação emergente neste tipo de matriz. A redução do uso de solvente e materiais como um todo diminuiu o tempo e custo de análise. Apesar de originalmente não apresentar fator de concentração, com algumas modificações experimentais como redução do volume de acetonitrila em relação ao volume de amostra e diminuição do volume de redissolução, é possível incluir certa pré-concentração ao método.

Apesar disso, o método QuEChERS ainda é manual e necessita de trabalhos futuros para minimizar manipulação da amostra e aumentar a frequência analítica. A associação do método QuEChERS às ferramentas quimiométricas como os planejamentos experimentais, possibilita a otimização mais rápida de suas variáveis, bem como, a compreensão da influência dos fatores do método no sistema estudado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUNBIADE, F. O.; MOODLEY, B. Pharmaceuticals as emerging organic contaminants in Umgeni River water system, KwaZulu-Natal, South Africa. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, n. 11, p. 7273–7291, 2014.

ALBERO, B. et al. Ultrasound-assisted extraction of emerging contaminants from environmental samples. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 110–118, 2015.

ALBINET, A.; TOMAZ, S.; LESTREMAU, F. A really quick easy cheap effective rugged and safe (QuEChERS) extraction procedure for the analysis of particle-bound PAHs in ambient air and emission samples. **Science of the Total Environment**, v. 450–451, p. 31–38, 2013.

ALGHAMDI, A. F. Quantitative analysis of hydrochlorothiazide and its determination in a pharmaceutical preparation by HPLC. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 48, n. 12, p. 845–849, 2015.

AMADORI, M. F. et al. Extraction Method for the Determination of Atrazine, Deethylatrazine, and Deisopropylatrazine in Agricultural Soil Using Factorial Design. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 3, p. 483–491, 2013.

ANASTASSIADES, M. et al. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile. **Journal of AOAC International**, v. 86, n. 2, p. 412–431, 2003.

ANDRADE-EIROA, A. et al. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 641–654, 2016.

ANDREU, V.; PICÓ, Y. Determination of pesticides and their degradation products in soil: Critical review and comparison of methods. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 10–11, p. 772–789, 2004.

ANVISA. **RDC N° 166**, 2017. Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/coifa/pdf/rdc166.pdf>>

ANVISA. **Índice monográfico Atrazina**.

ANVISA. **Índice monográfico Diuron**.

ANVISA. **Índice monográfico Carbaril**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>>.

ANVISA. **Índice monográfico Carbendazim**.

ARCHANA, G.; DHODAPKAR, R.; KUMAR, A. Offline solid-phase extraction for preconcentration of pharmaceuticals and personal care products in environmental water and their simultaneous determination using the reversed phase high-performance liquid chromatography method. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 188, n. 9, p. 512, 2016.

ARIAS-ESTÉVEZ, M. et al. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 123, n. 4, p. 247–260, 2008.

ASENSIO-RAMOS, M. et al. Ionic liquid-dispersive liquid-liquid microextraction for the simultaneous determination of pesticides and metabolites in soils using high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 30, p. 4808–4816, 2011.

AUFARTOVÁ, J. et al. Determination of steroid hormones in biological and environmental samples using green microextraction techniques: An overview. **Analytica Chimica Acta**, v. 704, n. 1–2, p. 33–46, 2011.

AUGUSTO, F. et al. Microextração em fase sólida: princípios, métodos, sorventes e acoplamento com a cromatografia gasosa. In: **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2015. p. 144–154.

BARANOWSKA, I.; JOANNA, P. Simultaneous Determination of Biogenic Amines and Methylxanthines in Foodstuff — Sample Preparation with HPLC-DAD-FL Analysis. **Food Analytical Methods**, p. 963–972, 2015.

BARCELÓ, D.; HENNION, M. **Trace Determinants of Pesticides and their Degradation Products in Water. Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry**. Amsterdam: Elsevier, 1997.

BARKER, S. A. Matrix solid-phase dispersion. **Comprehensive Sampling and Sample Preparation**, v. 2, p. 299–310, 2012.

BARREIROS, L. et al. **Analysis of 17b-estradiol and 17a-ethinylestradiol in biological and environmental matrices - A review** *Microchemical Journal*, 2016.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Editora da Unicamp, 2001.

BARTH, T. et al. Extração líquido-líquido. In: **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2015. p. 30–39.

BEDASSA, T.; GURE, A.; MEGERSA, N. Modified QuEChERS Method for the

Determination of Multiclass Pesticide Residues in Fruit Samples Utilizing High-Performance Liquid Chromatography. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 8, p. 2020–2027, 2015.

BERGLÖF, T. et al. Carbendazim sorption-desorption in Vietnamese soils. **Chemosphere**, v. 48, n. 3, p. 267–273, 2002.

BERLIOZ-BARBIER, A. et al. Multi-residue analysis of emerging pollutants in sediment using QuEChERS-based extraction followed by LC-MS/MS analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 4, p. 1259–1266, 2014.

BIELSKÁ, L.; ŠMÍDOVÁ, K.; HOFMAN, J. Solid phase microextraction of organic pollutants from natural and artificial soils and comparison with bioaccumulation in earthworms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 100, n. 1, p. 44–52, 2014.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 651–666, 2007.

BOLLMANN, H. A.; EDWIGES, T. Avaliação da qualidade das águas do Rio Belém, Curitiba-PR, com o emprego de indicadores quantitativos e perceptivos. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 13, n. 4, p. 443–452, 2008.

BONANSEA, R. I.; AMÉ, M. V.; WUNDERLIN, D. A. Determination of priority pesticides in water samples combining SPE and SPME coupled to GC-MS. A case study: Suquia River basin (Argentina). **Chemosphere**, v. 90, n. 6, p. 1860–1869, 2013.

BOSCHER, A. et al. Development of a multi-class method for the quantification of veterinary drug residues in feedingstuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 41, p. 6394–6404, 2010.

BOTITSI, E.; FROSYNI, C.; TSIPI, D. Determination of pharmaceuticals from different therapeutic classes in wastewaters by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, n. 4, p. 1317–1327, 2007.

BOUAID, A. et al. Solid-phase microextraction method for the determination of atrazine and four organophosphorus pesticides in soil samples by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 939, p. 13–21, 2001.

BOURDAT-DESCHAMPS, M. et al. Multi-residue analysis of pharmaceuticals in aqueous environmental samples by online solid-phase extraction-ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Optimisation and matrix effects reduction by quick, easy, cheap, effective, . **Journal of**

Chromatography A, v. 1349, p. 11–23, 2014.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for Experimenters. An Introduction to design, Data analysis, and Model building**. New York: John Wiley & Sons, 1978.

BRADLEY, P. M. et al. Biotransformation of caffeine , cotinine , and nicotine in stream sediments: Implication for use as wastewater indicators SEDIMENTS: IMPLICATIONS FOR USE AS WASTEWATER INDICATORS. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, n. 6, p. 1116–1121, 2007.

BRAGANÇA, I. et al. QuEChERS: A new sample preparation approach for the determination of ibuprofen and its metabolites in soils. **Science of the Total Environment**, v. 433, p. 281–289, 2012.

BRONDI, S. H. G. et al. Evaluation of the QuEChERS method and gas chromatography-mass spectrometry for the analysis pesticide residues in water and sediment. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 86, n. 1, p. 18–22, 2011.

BRUZZONITI, M. C. et al. QuEChERS sample preparation for the determination of pesticides and other organic residues in environmental matrices: A critical review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 17, p. 4089–4116, 2014.

BURNS, D. T.; DANZER, K.; TOWNSHEND, A. Use of the terms “Recovery” and “Apparent Recovery” in Analytical Procedures. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 11, p. 2201–2205, 2002.

CALDAS, S. S. et al. Evaluation of a modified QuEChERS extraction of multiple classes of pesticides from a rice paddy soil by LC-APCI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 22, p. 11918–11926, 2011.

CAMINO-SÁNCHEZ, F. J. et al. Stir bar sorptive extraction: Recent applications, limitations and future trends. **Talanta**, v. 130, p. 388–399, 2014.

CANELA, M. C. et al. **Cafeína em águas de abastecimento**. São Carlos: Editora Cubo, 2014.

CAPPELINI, L. T. D. et al. Development of methodology for determination of pesticides residue in water by SPE/HPLC/DAD. **Environmental Technology**, v. 3330, n. September 2015, p. 1–6, 2012.

CERQUEIRA, M. B. R. et al. Evaluation of the QuEChERS method for the extraction of pharmaceuticals and personal care products from drinking-water

treatment sludge with determination by UPLC-ESI-MS/MS. **Chemosphere**, v. 107, p. 74–82, 2014.

CERQUEIRA, M. B. R.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. New sorbent in the dispersive solid phase extraction step of quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe for the extraction of organic contaminants in drinking water treatment sludge. **Journal of Chromatography A**, v. 1336, p. 10–22, 2014.

CHEN, Y. et al. Sample preparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, n. 1–2, p. 191–219, 2008.

CLARA, M.; STRENN, B.; KREUZINGER, N. Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: Investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration. **Water Research**, v. 38, n. 4, p. 947–954, 2004.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2006.

COMERTON, A. M.; ANDREWS, R. C.; BAGLEY, D. M. Practical overview of analytical methods for endocrine-disrupting compounds, pharmaceuticals and personal care products in water and wastewater. **Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences**, v. 367, n. 1904, p. 3923–39, 2009.

CORRALES, J. et al. Global assessment of bisphenol a in the environment: Review and analysis of its occurrence and bioaccumulation. **Dose-Response**, v. 13, n. 3, p. 1–29, 2015.

CUADROS-RODRÍGUEZ, L. et al. Principles of analytical calibration/quantification for the separation sciences. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1–2, p. 33–46, 2007.

CVETKOVIC, J. S. et al. Optimization of the QuEChERS extraction procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by gas chromatography-mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 8, n. 7, p. 1711–1720, 2016.

CZECH, T. et al. Fast analysis of 4-tert-octylphenol, pentachlorophenol and 4-nonylphenol in river sediments by QuEChERS extraction procedure combined with GC-QqQ-MS/MS. **Science of the Total Environment**, v. 557–558, p. 681–687, 2016.

DA SILVA, A. K. et al. Emerging pollutants - Part I: Occurrence, fate and transport. **Water Environment Research**, v. 85, n. 10, p. 1978–2021, 2013.

DANKYI, E. et al. Quantification of neonicotinoid insecticide residues in soils from cocoa plantations using a QuEChERS extraction procedure and LC-MS/MS. **Science of the Total Environment**, v. 499, n. 1, p. 276–283, 2014.

DE CARLO, R. M. et al. Evaluation of different QuEChERS procedures for the recovery of selected drugs and herbicides from soil using LC coupled with UV and pulsed amperometry for their detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 4, p. 1217–1229, 2015.

DE LIZ, M. V. et al. Sensitive estrogens determination in wastewater samples by HPLC and fluorescence detection. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 8, p. 1453–1460, 2017.

DIAS, A. C. V. et al. Analysis of estrogenic activity in environmental waters in Rio de Janeiro state (Brazil) using the yeast estrogen screen. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 120, p. 41–47, 2015.

DIMPE, K. M.; NOMNGONGO, P. N. Current sample preparation methodologies for analysis of emerging pollutants in different environmental matrices. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 82, p. 199–207, 2016.

DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ, J. et al. Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry for the determination of anthelmintic benzimidazoles in eggs using a QuEChERS with preconcentration as sample treatment. **Journal of Chromatography A**, v. 1278, p. 166–174, 2013.

DÓREA, H. S. Dispersão da matriz em fase sólida. In: **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2015. p. 80–87.

DRUGBANK. **Drug Bank**. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca>>. Acesso em: 22 jan. 2018.

ĐUROVIĆ, R. D.; ĐORĐEVIĆ, T. M. Effects of soil composition on solid phase microextraction determination of triazine and organophosphorus pesticides. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 47, n. 9, p. 851–857, 2012.

EC. Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002/657/EC). **Official Journal of the European Communities**, p. 8–36, 2002.

EPA. Method 3620C: Florisil Cleanup Sw-846. **US Environmental Protection Agency**, n. July, p. 1–28, 2014.

FACCO, J. F. et al. Optimization and validation of a multiresidue method for pesticide determination in maize using gas chromatography coupled to tandem mass

spectrometry. **Analytical Methods**, v. 7, n. 1, p. 359–365, 2015.

FARRÉ, M. et al. Achievements and future trends in the analysis of emerging organic contaminants in environmental samples by mass spectrometry and bioanalytical techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1259, p. 86–99, 2012.

FEDENIUK, R. W. et al. Development of LC-MS/MS methodology for the detection/determination and confirmation of chloramphenicol, chloramphenicol 3-O- β -D-glucuronide, florfenicol, florfenicol amine and thiamphenicol residues in bovine, equine and porcine liver. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 991, p. 68–78, 2015.

FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, v. 76, n. 2, p. 122–159, 2006.

FERNANDES, V. C. et al. Multiresidue pesticides analysis in soils using modified QuEChERS with disposable pipette extraction and dispersive solid-phase extraction. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 2, p. 376–382, 2013.

FROEHNER, S. et al. Inputs of domestic and industrial sewage in upper Iguassu, Brazil identified by emerging compounds. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 215, n. 1–4, p. 251–259, 2011.

FURINI, L. N. et al. Adsorption of carbendazim pesticide on plasmonic nanoparticles studied by surface-enhanced Raman scattering. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 465, p. 183–189, 2016.

GAFFNEY, V. J. et al. Análise de fármacos em águas por SPE-UPLC-ESI-MS/MS. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 138–149, 2014.

GAVRILESCU, M. et al. Emerging pollutants in the environment: Present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. **New Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 147–156, 2015.

GERÓNIMO, E. et al. A simple and rapid analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry for monitoring pesticide residues in soils from Argentina. **Analytical Methods**, v. 7, n. 22, p. 9504–9512, 2015.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 695–706, 2007.

GIACOMAZZI, S.; COCHET, N. Environmental impact of diuron transformation: A review. **Chemosphere**, v. 56, n. 11, p. 1021–1032, 2004.

GILART, N. et al. Selective materials for solid-phase extraction in environmental analysis. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 1, 2014.

GOMES, P. C. F. L. et al. Determination of steroids, caffeine and methylparaben in water using solid phase microextraction-comprehensive two dimensional gas chromatography-time of flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1299, p. 126–130, 2013.

GONZÁLEZ-CURBELO, M. Á. et al. Evolution and applications of the QuEChERS method. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 169–185, 2015.

GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. Á.; ASUERO, A. G. Intra-laboratory assessment of method accuracy (trueness and precision) by using validation standards. **Talanta**, v. 82, n. 5, p. 1995–1998, 2010.

GRAZIELI, C.; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 665–676, 2011.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

HEYDEN, Y. V.; MASSART, D. L. Review of the use of robustness and ruggedness in analytical chemistry. In: SMILDE, A. DE BOER, J. HENDRIKS, M. (Ed.). **Robustness of Analytical Methods and Pharmaceutical Technological Products**. Netherlands: Elsevier, 1996. p. 79–147.

HOANG, V. D. et al. Simultaneous determination of chloramphenicol, dexamethasone and naphazoline in ternary and quaternary mixtures by RP-HPLC, derivative and wavelet transforms of UV ratio spectra. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 139, p. 20–27, 2015.

HOMAZAVA, N. et al. Simultaneous multi-residue pesticide analysis in soil samples with ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using QuEChERS and pressurised liquid extraction methods. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 94, n. 11, p. 1085–1099, 2014.

HOU, X. et al. A multi-residue method for the determination of pesticides in tea using multi-walled carbon nanotubes as a dispersive solid phase extraction absorbent. **Food Chemistry**, v. 153, p. 121–129, 2014.

HUANG, S. et al. Determination of eight pharmaceuticals in an aqueous sample using automated derivatization solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. **Talanta**, v. 136, p. 198–203, 2015.

HUERTA-FONTELA, M. et al. Occurrence of psychoactive stimulatory drugs

in wastewaters in north-eastern Spain. **Science of the Total Environment**, v. 397, n. 1–3, p. 31–40, 2008.

HYDE, A. M. et al. General Principles and Strategies for Salting-Out Informed by the Hofmeister Series. **Organic Process Research and Development**, v. 21, n. 9, p. 1355–1370, 2017.

IAP. **Qualidade das Águas – Rios da Bacia do Alto Iguaçu, na Região Metropolitana de Curitiba, 2005 a 2009**, 2009.

ICH. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)ICH Harmonised Tripartite Guideline.**, 2005.

INMET. **Estações e dados.** Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede_estacoes_auto_graf>. Acesso em: 8 jan. 2018.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos DOQ-CGCRE-008**, 2010.

IPARDES. **Indicadores de desenvolvimento sustentável por bacias hidrográficas do Estado do Paraná**, 2017.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida : Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13–25, 2010.

JARDIM, I. C. S. F. Princípios da extração em fase sólida. In: **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2015. p. 62–79.

JURADO, A. et al. Emerging organic contaminants in groundwater in Spain: A review of sources, recent occurrence and fate in a European context. **Science of the Total Environment**, v. 440, p. 82–94, 2012.

KACZYŃSKI, P. et al. Rapid determination of acid herbicides in soil by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection based on dispersive solid phase extraction. **Talanta**, v. 152, p. 127–136, 2016.

KARAGEORGOU, E. G.; SAMANIDOU, V. F. Development and validation according to European Union Decision 2002/657/EC of an HPLC-DAD method for milk multi-residue analysis of penicillins and amphenicols based on dispersive extraction by QuEChERS in MSPD format. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 15, p. 1893–1901, 2011.

KARAGEORGOU, E.; SAMANIDOU, V. Youden test application in robustness

assays during method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1353, p. 131–139, 2014.

KEMMERICH, M. et al. Optimization by Central Composite Design of a Modified QuEChERS Method for Extraction of Pesticide Multiresidue in Sweet Pepper and Analysis by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 3, p. 728–739, 2015.

KIM, S. et al. PubChem substance and compound databases. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D1202–D1213, 2016.

KOŚCIELNIAK, P.; WIECZOREK, M. Univariate analytical calibration methods and procedures. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 944, p. 14–28, 2016.

KUSTER, M. et al. Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). **Journal of Hydrology**, v. 358, n. 1–2, p. 112–123, 2008.

LAPWORTH, D. J. et al. Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. **Environmental Pollution**, v. 163, p. 287–303, 2012.

LEHOTAY, S. J. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe Approach for Determining Pesticide Residues. **Pesticide Protocols**, p. 239–261, 2006.

LEONG, M. I.; HUANG, S. DA. Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop for extraction of organochlorine pesticides in water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 45, p. 7645–7650, 2009.

LESUEUR, C. et al. Comparison of four extraction methods for the analysis of 24 pesticides in soil samples with gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-ion trap-mass spectrometry. **Talanta**, v. 75, n. 1, p. 284–293, 2008.

LEWIS, K. A. et al. An international database for pesticide risk assessments and management. **Human and Ecological Risk Assessment**, v. 22, n. 4, p. 1050–1064, 2016.

LI, M. et al. Chemometric-assisted QuEChERS extraction method for post-harvest pesticide determination in fruits and vegetables. **Scientific Reports**, v. 7, p. 42489, 2017.

LI, S. et al. A statistical approach to determine fluxapyroxad and its three metabolites in soils, sediment and sludge based on a combination of chemometric tools

and a modified quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method. **Journal of Chromatography A**, v. 1358, p. 46–51, 2014.

LI, S. et al. Chemometric-assisted QuEChERS extraction method for the residual analysis of thiacloprid, spirotetramat and spirotetramat's four metabolites in pepper: Application of their dissipation patterns. **Food Chemistry**, v. 192, p. 893–899, 2016.

LI, W. C. Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. **Environmental Pollution**, v. 187, p. 193–201, 2014.

LI, Y. et al. Development of a multi-residue enantiomeric analysis method for 9 pesticides in soil and water by chiral liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Hazardous Materials**, v. 250–251, p. 9–18, 2013.

LINTELMANN, J. et al. Endocrine disruptors in the environment. **Pure and Applied Chemistry**, v. 75, n. 5, p. 631–681, 2003.

LIU, A. et al. Identification of two novel brominated contaminants in water samples by ultra-high performance liquid chromatography-Orbitrap Fusion Tribrid mass spectrometer. **Journal of Chromatography A**, v. 1377, p. 92–99, 2015.

LIU, X. QIN et al. A multi-residue method for simultaneous determination of 74 pesticides in Chinese material medica using modified QuEChERS sample preparation procedure and gas chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1015–1016, p. 1–12, 2016.

LIU, Z. HUA; KANJO, Y.; MIZUTANI, S. Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment - physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: A review. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 2, p. 731–748, 2009.

LORENZ, J. G. et al. Multivariate optimization of the QuEChERS-GC-ECD method and pesticide investigation residues in apples, strawberries, and tomatoes produced in Brazilian South. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 9, p. 1583–1591, 2014.

ŁOZOWICKA, B. et al. Comparison of Extraction Techniques by Matrix Solid Phase Dispersion and Liquid-Liquid for Screening 150 Pesticides from Soil, and Determination by Gas Chromatography. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 21, n. 4, p. 973–992, 2012.

ŁOZOWICKA, B.; RUTKOWSKA, E.; JANKOWSKA, M. Influence of

QuEChERS modifications on recovery and matrix effect during the multi-residue pesticide analysis in soil by GC/MS/MS and GC/ECD/NPD. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 8, p. 7124–7138, 2017.

LUO, L. et al. Determination of 4-n-octylphenol, 4-n-nonylphenol and bisphenol A in fish samples from lake and rivers within Hunan Province, China. **Microchemical Journal**, v. 132, p. 100–106, 2017.

MACHADO, K. C. et al. A preliminary nationwide survey of the presence of emerging contaminants in drinking and source waters in Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 572, p. 138–146, 2016.

MACHADO, S. C. et al. QuEChERS-HPLC-DAD method for sulphonamides in chicken breast. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 1, p. 155–166, 2013.

MADEJ, K. Microwave-assisted and cloud-point extraction in determination of drugs and other bioactive compounds. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 4, p. 436–446, 2009.

MADUREIRA, T. V. et al. Development and optimization of a HPLC-DAD method for the determination of diverse pharmaceuticals in estuarine surface waters. **Journal of chromatographic science**, v. 48, n. March, p. 176–182, 2010.

MAGNUSSON, B.; ÖRNEMARK, U. **Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics**. Eurachem, 2014. Disponível em: <<http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/valid.pdf>>

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. Determination of some organic contaminants in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 100, p. 38–44, 2012.

MANTZOS, N. et al. QuEChERS and solid phase extraction methods for the determination of energy crop pesticides in soil, plant and runoff water matrices. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 93, n. 15, p. 1566–1584, 2013.

MAPA. **Manual de garantia da qualidade analítica**. 1. ed. Brasília: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Manual de garantia da qualidade analítica. / Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária, 2011.

MARTÍNEZ-LARA, J. M.; PÁEZ MELO, M. I. Diseño de experimentos aplicado

en la optimización del método de extracción QuEChERS para la determinación de plaguicidas organoclorados y organofosforados en suelos. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, v. 33, n. 4, p. 559–573, 2017.

MARTINOVIC-WEIGELT, D. et al. Environmental estrogens in an urban aquatic ecosystem: I. Spatial and temporal occurrence of estrogenic activity in effluent-dominated systems. **Environment International**, v. 61, p. 127–137, 2013.

MARTINS, G. L. et al. Simultaneous LC-MS/MS determination of imidazolinone herbicides together with other multiclass pesticide residues in soil. **Clean - Soil, Air, Water**, v. 42, n. 10, p. 1441–1449, 2014.

MARTINS, M. L. et al. Evaluation of an alternative fluorinated sorbent for dispersive solid-phase extraction clean-up of the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method for pesticide residues analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1514, p. 36–43, 2017.

MASIÁ, A. et al. Assessment of two extraction methods to determine pesticides in soils, sediments and sludges. Application to the Túria River Basin. **Journal of Chromatography A**, v. 1378, p. 19–31, 2015.

MATTAROZZI, M. et al. Optimization of a rapid QuEChERS sample treatment method for HILIC-MS2 analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins in mussels. **Food Control**, v. 60, p. 138–145, 2016.

MEI, M.; DU, Z. X.; CEN, Y. QuEChERS-ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for determination of five currently used herbicides. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 39, n. 11, p. 1659–1664, 2011.

MENTEN, J. O. **Consumo de produtos fitossanitários no Brasil**. Disponível em: <<http://sindiveg.org.br/consumo-de-produtos-fitossanitarios-no-brasil/>>.

MERDASSA, Y.; LIU, J. F.; MEGERSA, N. Development of a one-step microwave-assisted extraction method for simultaneous determination of organophosphorus pesticides and fungicides in soils by gas chromatography-mass spectrometry. **Talanta**, v. 114, p. 227–234, 2013.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 6th. ed. Gosport: Pearson, 2010.

MIN, G. et al. Multi-walled carbon nanotubes as solid-phase extraction adsorbents for determination of atrazine and its principal metabolites in water and soil samples by gas chromatography-mass spectrometry. **Science of the Total**

Environment, v. 396, n. 1, p. 79–85, 2008.

MITRA, S. **Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry**. Hoboken: Wiley-Interscience, 2003. v. 162

MNIF, W. et al. Effect of endocrine disruptor pesticides: A review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, n. 6, p. 2265–2303, 2011.

MOMPELAT, S.; LE BOT, B.; THOMAS, O. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. **Environment International**, v. 35, n. 5, p. 803–814, 2009.

MONTAGNER, C. C.; JARDIM, W. F. Spatial and seasonal variations of pharmaceuticals and endocrine disruptors in the Atibaia River, Sao Paulo State (Brazil). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 8, p. 1452–1462, 2011.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. 8th. ed. Arizona: John Wiley & Sons, 2012. v. 2

MORAIS, E. H. DA C.; BEGNINI, F. R.; JARDIM, I. C. S. F. Técnicas de preparo de amostra empregadas na determinação de agrotóxicos carbamatos em água e solo. **Scientia Chromatografica**, v. 5, n. 2, p. 146–162, 2013.

MURRAY, K. E.; THOMAS, S. M.; BODOUR, A. A. Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 12, p. 3462–3471, 2010.

NEMETH-KONDA, L. et al. Sorption behaviour of acetochlor, atrazine, carbendazim, diazinon, imidacloprid and isoproturon on Hungarian agricultural soil. **Chemosphere**, v. 48, n. 5, p. 545–552, 2002.

NENG, N. R.; NOGUEIRA, J. M. F. Determination of phenol compounds in surface water matrices by bar adsorptive microextraction-high performance liquid chromatography-diode array detection. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 9369–9379, 2014.

NIE, M. et al. Environmental estrogens in a drinking water reservoir area in Shanghai: Occurrence, colloidal contribution and risk assessment. **Science of the Total Environment**, v. 487, n. 1, p. 785–791, 2014.

NIETO, A. et al. Selective extraction of sulfonamides, macrolides and other pharmaceuticals from sewage sludge by pressurized liquid extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1174, n. 1–2, p. 125–131, 2007.

OLIVEIRA, M. F.; BRIGHENTI, A. M. Comportamento dos herbicidas no ambiente. In: **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Porto Alegre: Omnipax, 2011.

p. 263–304.

OLIVEIRA, R. S.; REGITANO, J. B. Dinâmica de pesticidas no solo. In: **Química e Mineralogia do Solo**. 1. ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2009. p. 188–248.

PACÁKOVÁ, V. et al. Analysis for estrogens as environmental pollutants - A review. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 5–6, p. 867–882, 2009.

PAÍGA, P.; DELERUE-MATOS, C. Determination of pharmaceuticals in groundwater collected in five cemeteries' areas (Portugal). **Science of the Total Environment**, v. 569–570, p. 16–22, 2016.

PAILLER, J.-Y. et al. Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg. **Science of The Total Environment**, v. 407, n. 16, p. 4736–4743, 2009.

PATROLECCO, L. et al. Simultaneous determination of human pharmaceuticals in water samples by solid phase extraction and HPLC with UV-fluorescence detection. **Microchemical Journal**, v. 107, p. 165–171, 2013.

PEDROUZO, M. et al. Presence of pharmaceuticals and hormones in waters from sewage treatment plants. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 217, n. 1–4, p. 267–281, 2011.

PENG, J. et al. Determination of atrazine, desethyl atrazine and desisopropyl atrazine in environmental water samples using hollow fiber-protected liquid-phase microextraction and high performance liquid chromatography. **Microchimica Acta**, v. 158, n. 1–2, p. 181–186, 2007.

PEREIRA FILHO, E. R. **Planejamento fatorial em química. Maximizando a obtenção de resultados**. 1. ed. São Carlos: EdUGSCar, 2015.

PERKINS, E. J. et al. Prioritization of Contaminants of Emerging Concern in Wastewater Treatment Plant Discharges Using Chemical:Gene Interactions in Caged Fish. **Environmental Science and Technology**, v. 51, n. 15, p. 8701–8712, 2017.

PETRARCA, M. H. et al. Optimisation of a sample preparation method for the determination of fumonisin B1 in rice. **Food Chemistry**, v. 158, p. 270–277, 2014.

PEYSSON, W.; VULLIET, E. Determination of 136 pharmaceuticals and hormones in sewage sludge using quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction followed by analysis with liquid chromatography-time-of-flight-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1290, p. 46–61, 2013.

PICCOLO, A. the Supramolecular Structure of Humic Substances. **Soil Science**, v. 166, n. 11, p. 810–832, 2001.

PIMENTEL, D.; LEVITAN, L. Pesticides: Amounts Applied and Amounts Reaching Pests. **BioScience**, v. 36, n. 2, p. 86–91, 1986.

PINTO, C. G. et al. Simplified QuEChERS approach for the extraction of chlorinated compounds from soil samples. **Talanta**, v. 81, n. 1–2, p. 385–391, 2010.

PLACKETT, A. R. L.; BURMAN, J. P. The Design of Optimum Multifactorial Experiments. **Biometrika**, v. 33, n. 4, p. 305–325, 2008.

PRESTES, O. D. et al. QuEChERS: um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620–1634, 2009.

PRIETO, A.; SCHRADER, S.; MOEDER, M. Determination of organic priority pollutants and emerging compounds in wastewater and snow samples using multiresidue protocols on the basis of microextraction by packed sorbents coupled to large volume injection gas chromatography-mass spectrometry analy. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 38, p. 6002–6011, 2010.

PRIMEL, E. G. et al. An overview of advances in dispersive liquid–liquid microextraction for the extraction of pesticides and emerging contaminants from environmental samples. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 14, p. 1–18, 2017.

PSZCZOLIŃSKA, K.; MICHEL, M. The QuEChERS Approach for the Determination of Pesticide Residues in Soil Samples: An Overview. **Journal of AOAC International**, v. 99, n. 6, p. 1403–1414, 2016.

RAHMAN, M. M. et al. Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe sample preparation approach for pesticide residue analysis using traditional detectors in chromatography: A review. **Journal of Separation Science**, v. 40, n. 1, p. 203–212, 2017.

RALLIS, G. N. et al. Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in post-mortem human lung by matrix solid-phase dispersion with the aid of response surface methodology and desirability function. **Journal of Chromatography A**, v. 1227, p. 1–9, 2012.

RASHID, A. et al. Development of a simple extraction and clean-up procedure for determination of organochlorine pesticides in soil using gas chromatography-

tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 17, p. 2933–2939, 2010.

REIS FILHO, R. W.; ARAÚJO, J. C.; VIEIRA, E. M. Hormônios sexuais estrógenos: Contaminantes bioativos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 817–822, 2006.

REJCZAK, T.; TUZIMSKI, T. QuEChERS-based extraction with dispersive solid phase extraction clean-up using PSA and ZrO₂-based sorbents for determination of pesticides in bovine milk samples by HPLC-DAD. **Food Chemistry**, v. 217, p. 225–233, 2017.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RIGI, M. R.; FARAHBAKHS, M.; REZAEI, K. Use of solid phase extraction with hydrophilic-lipophilic balance (HLB) cartridge as the appropriate option for metribuzin extraction from contaminated soils. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 1, p. 156–164, 2015.

RIMAYI, C. et al. Alternative calibration techniques for counteracting the matrix effects in GC-MS-SPE pesticide residue analysis - A statistical approach. **Chemosphere**, v. 118, n. 1, p. 35–43, 2015.

RIZZETTI, T. M. et al. Optimization of a QuEChERS based method by means of central composite design for pesticide multiresidue determination in orange juice by UHPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 196, p. 25–33, 2016.

RODIL, R. et al. Emerging pollutants in sewage, surface and drinking water in Galicia (NW Spain). **Chemosphere**, v. 86, n. 10, p. 1040–1049, 2012.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 2. ed. Campinas: Cárita, 2014.

ROSSINI, D. et al. Innovative combination of QuEChERS extraction with on-line solid-phase extract purification and pre-concentration, followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their metabolites. **Analytica Chimica Acta**, v. 935, p. 269–281, 2016.

ROUVIRE, F. et al. Multiresidue analysis of aromatic organochlorines in soil by gas chromatography-mass spectrometry and QuEChERS extraction based on water/dichloromethane partitioning. Comparison with accelerated solvent extraction. **Talanta**, v. 93, p. 336–344, 2012.

SALGUEIRO-GONZÁLEZ, N. et al. Trends in analytical methodologies for the

determination of alkylphenols and bisphenol A in water samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 962, p. 1–14, 2017.

SALVIA, M. V.; CREN-OLIVÉ, C.; VULLIET, E. Statistical evaluation of the influence of soil properties on recoveries and matrix effects during the analysis of pharmaceutical compounds and steroids by quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction followed by liquid chromatography-tandem. **Journal of Chromatography A**, v. 1315, p. 53–60, 2013.

SÁNCHEZ-BRUNETE, C. et al. Determination of triclosan and methyl triclosan in environmental solid samples by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 17–18, p. 2768–2775, 2010.

SANCHEZ-PRADO, L. et al. Microwave-assisted extraction of emerging pollutants in environmental and biological samples before chromatographic determination. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 119–143, 2015.

SANCO. Guidance document on pesticide residue analytical methods. **European Commission**, n. SANCO/825/00 rev. 8.1, p. 1–28, 2010.

SANTALADCHAIYAKIT, Y.; SRIJARANAI, S.; BURAKHAM, R. Methodological aspects of sample preparation for the determination of carbamate residues: A review. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 18, p. 2373–2389, 2012.

SANTE/EU. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. SANTE/11945/2015. **European Commission**, v. 11945, p. 1–42, 2015.

SAUVÉ, S.; DESROSIERS, M. A review of what is an emerging contaminant. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 1, p. Article 15, 2014.

SCHENCK, F. J. et al. Comparison of magnesium sulfate and sodium sulfate for removal of water from pesticide extracts of foods. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. April 2014, p. 4, 2002.

SCHMIDT, M. L.; SNOW, N. H. Making the case for QuEChERS-gas chromatography of drugs. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 75, p. 49–56, 2016.

SHI, C. et al. Determination of oxadiargyl residues in environmental samples and rice samples. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 84, n. 2, p. 236–239, 2010.

SHI, J.-W. et al. Development of a screening method for the determination of

PCBs in water using QuEChERS extraction and gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. **Analytical Sciences: The International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry**, v. 28, n. 2, p. 167–73, 2012.

SHI, X. Y. et al. Low concentrations of bisphenol A promote human ovarian cancer cell proliferation and glycolysis-based metabolism through the estrogen receptor-A pathway. **Chemosphere**, v. 185, p. 361–367, 2017.

SHIPITALO, M. J.; OWENS, L. B. Atrazine, deethylatrazine, and deisopropylatrazine in surface runoff from conservation tilled watersheds. **Environmental Science and Technology**, v. 37, n. 5, p. 944–950, 2003.

SHRIVASTAVA, A.; GUPTA, V. B. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. **Chronicles of Young Scientists**, v. 2, n. 1, p. 21–25, 2011.

SINGH, S. et al. Toxicity, monitoring and biodegradation of the fungicide carbendazim. **Environmental Chemistry Letters**, v. 14, n. 3, p. 317–329, 2016.

SKOOG, D. A. et al. Fundamentos de Química Analítica. **Fundamentos de Química Analítica**, v. 58, p. 374, 2005.

SMITH, R. M. Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1, p. 3–27, 2003.

SODRÉ, F. F. et al. Ocorrência de Interferentes Endócrinos e Produtos Farmacêuticos em Águas Superficiais da Região de Campinas (SP, Brasil). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, n. 2, p. 187–196, 2007.

SODRÉ, F. F. et al. Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 96, n. 1, p. 92–98, 2010.

SOLOMON, G. M.; SCHETTLER, T. Environment and health: 6. Endocrine disruption and potential human health implications. **Canadian Medical Association Journal**, v. 163, n. 11, p. 1471–6, 2000.

SOUZA-SILVA, É. A. et al. A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices I. Environmental analysis. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 224–235, 2015.

SPARK, K. M.; SWIFT, R. Effect of soil composition and dissolved organic matter on pesticide sorption. **The Science of the Total Environment**, v. 298, n. 1–3, p. 147–161, 2002.

STOLKER, A. A. M. et al. Liquid chromatography with triple-quadrupole or quadrupole-time of flight mass spectrometry for screening and confirmation of residues of pharmaceuticals in water. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, n. 4, p. 955–963, 2004.

STUART, M. et al. Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. **Science of the Total Environment**, v. 416, p. 1–21, 2012.

STUMPF, M. et al. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 225, p. 135–141, 1999.

SUBEDI, B. et al. Selective pressurized liquid extraction as a sample-preparation technique for persistent organic pollutants and contaminants of emerging concern. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 68, p. 119–132, 2015.

SUTTON, R.; SPOSITO, G. Molecular structure in soil humic substances: The new view. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 23, p. 9009–9015, 2005.

SVERSUT, R. A. et al. Stability-indicating HPLC-DAD method for the simultaneous determination of fluoroquinolones and corticosteroids in ophthalmic formulations. **Analytical Methods**, v. 6, n. 7, p. 2125, 2014.

TADEO, J. L. et al. Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2415–2440, 2010.

TANKIEWICZ, M.; FENIK, J.; BIZIUK, M. Solventless and solvent-minimized sample preparation techniques for determining currently used pesticides in water samples: A review. **Talanta**, v. 86, n. 1, p. 8–22, 2011.

TECHNICAL, I. C. O. H. O.; USE, R. F. R. O. P. F. H. ICH Harmonised Tripartite Guideline Text on Validation of Analytical Procedures. **Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015**, v. 1, n. October, p. 1–6, 1996.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338–350, 2006.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.

TIJANI, J. O.; FATOBA, O. O.; PETRIK, L. F. A review of pharmaceuticals and

endocrine-disrupting compounds: Sources, effects, removal, and detections. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 224, n. 11, 2013.

TORRES, N. H. et al. Detection of hormones in surface and drinking water in Brazil by LC-ESI-MS/MS and ecotoxicological assessment with *Daphnia magna*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 6, 2015.

TUZIMSKI, T.; REJCZAK, T. Application of HPLC-DAD after SPE/QuEChERS with ZrO₂-based sorbent in d-SPE clean-up step for pesticide analysis in edible oils. **Food Chemistry**, v. 190, p. 71–79, 2016.

UNESCO. **Emerging Pollutants in Water and Wastewater**. Disponível em: <<https://en.unesco.org/emergingpollutants>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

USDA. Soil Survey Manual. Agriculture Handbook n° 18. **Soil Science**, n. 18, p. 483, 2017.

USEPA. **Water: Contaminant Candidate List 3 (CCL3). United States Environmental Protection Agency** **Water: Contaminant Candidate List 3**, 2009.

USEPA. **Pesticides Industry Sales and Usage Report 2006 and 2007 Market Estimates**, 2011.

VALLS-CANTENYS, C. et al. A sensitive multi-residue method for the determination of 35 micropollutants including pharmaceuticals, iodinated contrast media and pesticides in water. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 22, p. 6189–6200, 2016.

VERBINNEN, R. T.; NUNES, G. S.; VIEIRA, E. M. Determinação de hormônios estrógenos em água potável usando CLAE-DAD. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1837–1842, 2010.

VIERA, M. S. et al. Multiresidue determination of pesticides in crop plants by the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method and ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry using a calibration based on a single level standard addition i. **Journal of Chromatography A**, v. 1526, p. 119–127, 2017.

VYMAZAL, J.; BŘEZINOVÁ, T.; KOŽELUH, M. Occurrence and removal of estrogens, progesterone and testosterone in three constructed wetlands treating municipal sewage in the Czech Republic. **Science of the Total Environment**, v. 536, p. 625–631, 2015.

WANG, W. et al. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides from soils: A comparison between Soxhlet extraction,

microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 602, n. 2, p. 211–222, 2007.

WANG, X. et al. Homogeneous liquid-liquid extraction combined with gas chromatography-electron capture detector for the determination of three pesticide residues in soils. **Analytica Chimica Acta**, v. 620, n. 1–2, p. 162–169, 2008.

WARING, R. H.; HARRIS, R. M. Endocrine disrupters: A human risk? **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 244, p. 2–9, 2005.

WEI, J. et al. Trace determination of five organophosphorus pesticides by using QuEChERS coupled with dispersive liquid–liquid microextraction and stacking before micellar electrokinetic chromatography. **Analytical Methods**, v. 7, p. 5801–5807, 2015.

WHO. **Pharmaceutical Industry**. Disponível em: <<http://www.who.int/trade/glossary/story073/en>>. Acesso em: 10 jul. 2015.

WU, X. et al. Determination of herbicide propisochlor in soil, water and rice by quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS) method using by UPLC-ESI-MS/MS. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 34, n. 3, p. 917–921, 2013.

XIONG, L. et al. Simple and sensitive monitoring of β 2 -agonist residues in meat by liquid chromatography – tandem mass spectrometry using a QuEChERS with preconcentration as the sample treatment. **Meat Science**, v. 105, p. 96–107, 2015.

YIN, X. L. et al. Chemometrics-enhanced high performance liquid chromatography-diode array detection strategy for simultaneous determination of eight co-eluted compounds in ten kinds of Chinese teas using second-order calibration method based on alternating trilinear deconvolution. **Journal of Chromatography A**, v. 1364, p. 151–162, 2014.

ZANELLA, R. et al. QuEChERS. In: **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. 1. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015. p. 230–244.

ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, A. Application of DLLME to Isolation and Concentration of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Environmental Water Samples. **Chromatographia**, v. 72, n. 7, p. 671–678, 2010.

ZHOU, J. et al. Optimization for quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction of mycotoxins and veterinary drugs by response surface methodology for application to egg and milk. **Journal of Chromatography A**, v. 1532, p. 20–29, 2018.

ZHU, H. et al. Extraction of natural estrogens in environmental waters by dispersive multiwalled carbon nanotube- based agitation-assisted adsorption and.

Analytical Methods, p. 1235–1241, 2014.

ZIYLAN, A.; INCE, N. H. The occurrence and fate of anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals in sewage and fresh water: Treatability by conventional and non-conventional processes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 187, n. 1–3, p. 24–36, 2011.